

Hovedfagsoppgave i farmakologi

Uttrykk av P-glykoprotein i pankreas-øyceller ex vivo; påvirkning av immunsuppressiva

Kari Marie Førde



Utført ved

Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi,

Avdeling for medisinsk biokjemi,

Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF,

Institutt for klinisk biokjemi, Det medisinske fakultet og

Farmasøytisk Institutt, Det matematisk-vitenskaplige fakultet

Universitetet i Oslo

Høsten 2006

FORORD

Denne oppgaven er blitt til under veiledning av dr. philos. Stein Bergan og dr.med. Helge Rootwelt. Begge ved Avdeling for medisinsk biokjemi på Rikshospitalet. Oppgaven har blitt utført i tidsrommet november 2005 til oktober 2006.

I samarbeid med veilederne mine og stipendiat Sara Bremer, har jeg utviklet en spesifikk metode for kvantifisering av P-glykoprotein. Metoden er testet ut i en liten pilotstudie.

Jeg vil rette en stor takk til Stein og Helge som begge har vært svært engasjerte og ivrige veiledere gjennom hele året. Dere har gjort dette til et spennende og lærerikt år. En spesiell takk til Stein for at han alltid, selv på de travleste dagene, har tatt seg tid til å svare på spørsmål og gi råd.

En stor takk til stipendiat Sara Bremer som tålmodig har lært bort teknikker, kommet med nye idéer, hjulpet meg når jeg har stått fast og hele tiden har vært blid og positiv. Jeg vil også takke stipendiatene Nils Tore Vethe og Randeep Mandla for hyggelige og givende diskusjoner underveis.

Takk også til bioingeniørene på SAFE, ved Laila Gjerdalen, som har vært med på å gjøre laboratoriet til en hyggelig og inspirerende arbeidsplass.

Takk til ”øycellegruppen” (ved blant andre Aksel Foss, Hanne Scholz og Tormod Lund) for hyggelig samarbeid og god hjelp.

En stor takk rettes også til professor Anders Åsberg som har vært en engasjert internveileder og kontaktperson ved Farmasøytisk Institutt.

Til slutt vil jeg takke min familie og samboer for støtte, gjennomlesing av oppgaven og for å ha vist interesse for det jeg har holdt på med dette året.

Oslo, oktober 2006

INNHold

FORORD

FORKORTELSER.....	3
1. SAMMENDRAG.....	5
2. INTRODUKSJON.....	9
2.1 Transplantasjon.....	9
2.2 Diabetes mellitus.....	9
2.2.1 Behandling av diabetes mellitus.....	10
2.2.2 Insulin.....	10
2.2.3 Pankreas.....	10
2.3 Transplantasjon av øyceller.....	12
2.4 Rejeksjon.....	12
2.5 Immunsuppressiv behandling.....	14
3. P-GLYKOPROTEIN.....	15
3.1 Funksjon og lokalisasjon.....	15
3.2 Struktur.....	16
3.3 Virkemåte.....	18
3.4 Reguleringspunkter.....	19
3.5 Variasjon i genuttrykk; hemming og induksjon.....	20
3.6 Polymorfismer.....	22
4. BAKGRUNN FOR GENEKSPRESJONSANALYSE.....	23
5. ETABLERING AV METODEN.....	24
5.1 Polymerasekjedereaksjon.....	24
5.2 Revers transkriptase-PCR (RT-PCR).....	25
5.3 Sanntids-PCR.....	26
5.4 Primere og prober.....	28
5.5 SYBR Green I.....	30
5.6 Husholdningsgener.....	31
5.7 Optimalisering av metoden.....	31
5.7.1 MgCl ₂	31
5.7.2 Temperatur.....	32
5.7.3 Primere.....	32
5.7.4 Prober.....	32
5.8 Standardkurve.....	33
5.8.1 Amplifisering av produkt, forberedelser til gelelektroforese.....	34
5.8.2 Laging og støping av gel.....	35
5.8.3 Rensing av PCR-produkt	35

5.8.4 Kvantitering av produkt.....	36
5.8.5 Fortynningsserie og standardkurve.....	36
6. RESULTATER.....	37
6.1 Etablering av metoden.....	37
6.1.1 Endelig metode.....	37
6.2 Påvisning av P-glykoprotein i øyceller.....	39
6.3 P-glykoproteinvariasjon etter inkubering av øycelle-materiale med metylprednisolon.....	40
7. DISKUSJON.....	44
7.1 Metoden.....	44
7.1.1 Prøveopparbeidelse.....	44
7.1.2 Valg av reagenser.....	44
7.1.3 Valg av analysemetode.....	44
7.2 Kvantifisering.....	45
7.2.1 Husholdningsgener.....	45
7.2.2 Kalibratornormalisering.....	46
7.3 De Langerhanske øyene.....	46
7.3.1 Tidsaspekter.....	46
7.3.2 Prosedyren for isolering av øycelle-materiale.....	47
7.3.3 Metylprednisolon-konsentrasjon.....	47
7.4 Konklusjoner.....	47
7.5 Videre studier.....	48
8. APPENDIKS.....	52
8.1 Reagenser.....	52
8.2 RNA-isolering / cDNA-syntese.....	53
8.3 Tilberedning av primer- og probestamløsninger.....	55
8.4 Forberedelser til PCR.....	56
8.5 Pipettering i LightCycler-kapillærer.....	57
8.6 Eksperiment-protokoll, innstillinger i LightCycler-programmet for analysering med prober.....	58
8.7 Resultater.....	59
9. LITTERATURLISTE.....	62

FORKORTELSER

A	adenin
ABC-transportør	ATB-binding cassette transportør
ABO	blodtypesystem som skriver seg fra variasjon i karbohydratkjeder som sitter festet til cellemembranen
ALAS	5-aminolevulinat syntase
ATP	adenosine 5'-trifosfat
β_2 M	β_2 -mikroglobulin
C	cytosin
cDNA	komplementær-DNA, kopi-DNA (komplementært til mRNA)
Cp	crossing point (terskel for fluorescensøkning som angir påviselige mengder PCR-produkt ved sanntids kvantitativ PCR)
DNA	deoksyribonukleinsyre
g	måleenhet for sentrifugalkraft
G	guanin
G6PDH	glukose-6-fosfat-dehydrogenase
HDL-kolesterol	High Density Lipoproteins (det “gode” kolesterolet)
HLA	Human Leucocyte Antigen (humant leukocyttantigen)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LAF-benk	laminar airflow-benk
MHC	Major Histocompatibility Complex (vevsforlikelighetsantigenkomplekset)
MgCl ₂	magnesiumklorid
mRNA	messenger RNA, budbringer-RNA
MS2-RNA	RNA til bakteriofagen MS2
Pancreas	bukspyttkjertel
PP-celler	pankreatiske polypeptid-celler
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerase-kjedereaksjon)
Portåren	vena porta
Rhesus	blodtypesystem som er knyttet til variasjon i membranproteiner
REST	relative expression software tool
RNA	ribonukleinsyre
RT	revers transkripsjon
RT-PCR	revers transkriptase polymerase-kjedereaksjon

SNP	single nucleotide polymorphism (enkeltnukleotidpolymorfisme)
T	tymin
TAE-buffer	Tris-Acetate-EDTA-buffer
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
U	uracil
UV	ultrafiolett
Øyceller	Langerhanske øyer i pankreas, ”islets”

1. SAMMENDRAG

Etter en transplantasjon av celler, vev eller organer mellom individer av samme art, må pasientene få immunsuppressiv behandling. Dette gjøres for å redusere risikoen for avstøtningsreaksjon. En avstøtningsreaksjon (rejeksjon) er immunsystemets naturlige respons for å beskytte kroppen mot fremmede substanser.

Den vanligste formen for transplantasjon i Norge har i flere år vært transplantasjon av nyrer. Antallet lever- og hjertetransplantasjoner ligger betydelig lavere. Det er først nå i den senere tid at det har blitt aktuelt å transplantere øyceller, hormonproduserende celler som ligger i bukspyttkjertelen. En av celletypene i disse øyene er betaceller som produserer insulin. Pasienter med type 1-diabetes har mangelfull insulinproduksjon. Ved en transplantasjon kan de enten få operert inn en hel bukspyttkjertel eller få sprøytet inn isolerte øyceller fra pankreas fra avdøde givere. Den siste formen for transplantasjon er fortsatt helt i startfasen. I Norge fant den første transplantasjonen av øyceller sted i 2001 (1). I første halvår av 2006 ble det utført 3 slike transplantasjoner ved Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF (2). Ved en slik øycelletransplantasjon er det flere utfordringer. Det største problemet er mangel på donorer. Man har fortsatt ikke funnet isoleringsmetoder som gir en god nok utnyttelse av øycellene, dvs. at øyceller fra én donor er nok til å gjøre én pasient insulinfri. Isoleringsutbyttet ligger på rundt 1/3 av øycellene i donors pankreas. I tillegg går store mengder øyceller tapt etter transplantasjonen, og ny transplantasjon etter kort tid er ikke uvanlig for å holde pasienten insulinfri. Gjennomsnittet for antall transplantasjoner, og dermed antall donorbukspyttkjertler, per pasient ligger på 2. Men alt fra 1 til 3 transplantasjoner regnes som normalt. Ett år etter transplantasjon er 44 % av pasientene uavhengige av insulin og de har god glykemisk kontroll. Men av disse er det bare 31 % som fortsatt er uavhengige av insulin etter 2 år (dvs. totalt 14 % av de transplanterte) (3). Årsaken til at en del av øycellene går tapt etter transplantasjon, er ikke fullstendig kartlagt.

Pasienter som har gjennomgått en øycelletransplantasjon blir, på lik linje med andre transplanterte, behandlet med immunsuppressiva for å hindre avstøtning. Det har blitt spekulert i om store doser immunsuppressiva kan være direkte toksisk for øycellene. Det isolerte øycelle-materialet blir injisert i portåren og slår seg ned i leveren (se figur 1). Der utvikler øyene sin egen blodtilførsel og begynner etter hvert å produsere insulin igjen, som respons på svingninger i blodsukkeret (4). Fordi celleøyene transporteres til leveren via

portåren, vil de komme i kontakt med immunsuppressiva før disse har blitt metabolisert i leveren, det vil si *før* førstepassasjemetabolismen. Den dosen immunsuppressiva som øyene utsettes for, vil ikke være i samsvar med den konsentrasjonen som måles i blodet.

Konsentrasjonene vil være betydelig høyere i portåren enn de man oppnår etter førstepassasjemetabolisme. Teorien om at immunsuppressiva kan være direkte toksisk for øycellene, og at en høy konsentrasjon i portåren kan bidra til celletapet som sees etter en transplantasjon, er derfor meget interessant.

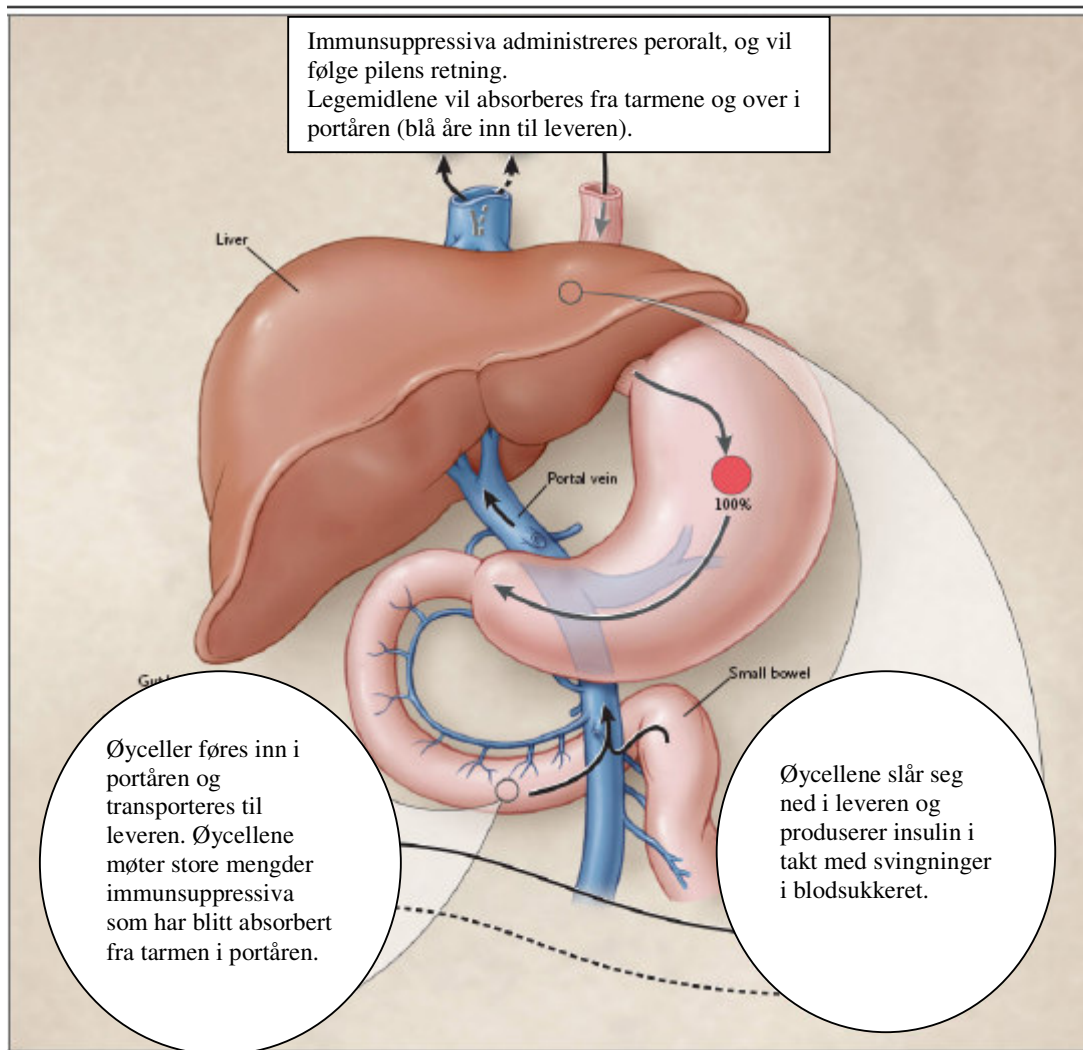
Som standard behandling rett før, under og etter en transplantasjon, får pasientene metylprednisolon. Bruk av prednisolon har vist seg generelt å redusere reaksjonstilfellene ved organtransplantasjon, og det kan hende at steroidene også bidrar til å redusere svinnet av øycellene. En teori er at steroidene beskytter øycellene mot den toksiske effekten som utøves av ulike andre immunsuppressiva. Steroidene kan gjøre dette ved å oppregulere P-glykoprotein, en transmembran transportør som pumper molekyler, deriblant andre immunsuppressiva, ut av cellene ved hjelp av ATP-hydrolyse. En eventuell oppregulering av P-glykoprotein kan føre til at den intracellulære konsentrasjonene av immunsuppressiva ikke blir så høy, og i følge teorien om at immunsuppressiva har en toksisk effekt på øycellene, vil en oppregulering ha en beskyttende effekt på dem.

I oppgaven skal det fokuseres på dette transportproteinet. Vi skal forsøke å avdekke om mRNA for P-glykoprotein (og dermed sannsynligvis P-glykoprotein selv) finnes i de Langerhanske øyene, og i så fall om P-glykoprotein-uttrykket påvirkes av steroider. Det er allerede kjent at P-glykoprotein påvirkes av immunsuppressiva (5). Det er også kjent at steroider kan påvirke genreguleringen.

Per dags dato finnes det ikke noen etablert metode for kvantitativ bestemmelse av mRNA-uttrykk av P-glykoprotein i ulike cellepopulasjoner, så dette må etableres. Metodeutvikling vil derfor være en stor del av oppgaven.

Ved å isolere total-RNA fra øycelle-materiale, som så kopieres til cDNA ved revers transkripsjon, kan man ved hjelp av PCR sannsynliggjøre om det finnes P-glykoprotein i øyene eller ikke.

Dersom P-glykoprotein blir påvist i øycelle-materialet, vil det være aktuelt å gå videre og se på eventuelle ekspresjonsendringer av P-glykoprotein avhengig av steroid-dose tilsatt cellemediet. Som kjent påvirker steroider genuttrykket til mange proteiner, og pasienter som har gjennomgått en øycelletransplantasjon, blir behandlet med steroider. Det er derfor interessant å se om steroidene påvirker transportproteinet, som kan tenkes å beskytte øycellene rett etter en transplantasjon.



Figur 1

Forklaring på høy konsentrasjon av immunosuppressiva i portåren.

Legemidler absorberes, som vist på figuren, fra tarmen og inn i portåren som så går til leveren. Her vil legemidlene metaboliseres før de kommer ut i systemisk sirkulasjon ("førstepassasjemetabolisme"). Ved en øycelletransplantasjon, sprøytes øyceller direkte inn i portåren og øyene møter dermed legemidlene før de har vært igjennom førstepassasjemetabolisme. Konsentrasjonene vil derfor være betydelig høyere her enn de man måler i serum. Øycellene følger portåren til leveren og slår seg ned der (6).

2. INTRODUKSJON

2.1 Transplantasjon

Det finnes ulike former for transplantasjoner. En transplantasjon som innebærer flytting av vev eller celler fra et sted til et annet i samme individ, kalles en autotransplantasjon. Et eksempel er hudtransplantasjon ved store brannskader. Transplantasjon mellom eneggede tvillinger betegnes isotransplantasjon. Ved xenotransplantasjon er giver og mottaker fra forskjellige arter. Xenotransplantasjon er i dag en eksperimentell form for transplantasjon, men grunnet mangel på organer for transplantasjon foregår det i dag en intens forskning hvor målsetningen er at xenotransplantasjon skal bli en behandlingsmetode (7). Overføring av celler eller vev mellom to individer av samme art kalles en allogen transplantasjon, og hensikten med denne er å erstatte et sviktende organ. Det er dette som benyttes ved blant annet irreversibel hjerte-, lunge-, lever- eller nyresvikt, og ved øycelletransplantasjon. Nyresvikt er for øvrig den hyppigste årsaken til organtransplantasjon (8). Det blir foretatt mellom 200 og 300 nyretransplantasjoner i Norge hvert år. I 2004 ble det utført totalt 265 nyretransplantasjoner. Til sammenligning ble det i det samme året (2004) foretatt totalt 9 transplantasjoner av øyceller i Norge (1).

Verdens første vellykkede nyretransplantasjonen ble utført i Boston, USA, i 1954. Dette var en nyretransplantasjon mellom eneggede tvillinger. Den første nyretransplantasjonen i Norden ble utført bare to år etter dette, på Rikshospitalet i 1956. Rikshospitalet har siden 1983 fungert som nasjonalt senter for transplantasjonskirurgi (9).

2.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus er en kronisk stoffskiftesykdom med høyt blodsukker (hyperglykemi) og andre metabolske forstyrrelser som skyldes absolutt eller relativ insulinmangel, ofte sammen med nedsatt insulinvirkning (insulinresistens). En ekspertgruppe nedsatt av WHO (1998) har foreslått inndeling i fire hovedgrupper:

Type 1-diabetes, type 2-diabetes, andre typer diabetes mellitus som genetiske defekter i betacelle-funksjonen og insulinvirkningen, sykdommer i pankreas, endokrinopatier, effekter av legemidler o.a, og svangerskapdiabetes som siste gruppe (10).

Type 1-diabetes kan debutere i alle aldre og skyldes insulinmangel, vanligvis pga. en autoimmun destruksjon av betacellene i de Langerhanske øyer. Den kliniske debut er ofte

akutt. Insulinbehovet kan være lavt i starten inntil alle betacellene er ødelagt og insulinmangelen blir total (10).

Type 2-diabetes kan også debutere i alle aldre. Type 2-diabetes skyldes insulinresistens og utilstrekkelig insulinproduksjon, og er ofte ledd i et insulinresistenssyndrom med abdominal (visceral) fedme, høyt blodtrykk, høye triglyserider, lavt HDL-kolesterol og økt tendens til aterosklerose (10).

2.2.1 Behandling av diabetes mellitus

Type 1-diabetes er insulinavhengig og injeksjoner med insulin er standard behandling for disse pasientene. Behandlingen av type 1-diabetes er så å si alltid substitusjon med insulin. Type 2-diabetes er i utgangpunktet ikke insulinavhengig, og reguleres i stor grad av kost, mosjon og perorale antidiabetika. Rundt 40 % av pasientene med type 2-diabetes vil likevel ha behov for insulinbehandling (10),(11).

2.2.2 Insulin

Humant insulin har siden 1980-tallet blitt fremstilt kunstig ved bruk av genetisk modifiserte mikroorganismer (sopp, gjær, bakterier) i tilstrekkelige mengder til utstrakt klinisk bruk, og dette har nærmest utradert problemene med urenheter. Eli Lilly og Novo Nordisk markedsførte i 1982 de første syntetiske insulinpreparatene fremstilt på denne måten. Teknikkene som ble brukt var utviklet av firmaet Genentech.

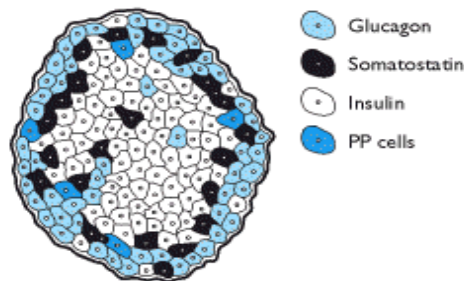
Til forskjell fra mange andre medisiner kan ikke insulin tas gjennom munnen (peroralt). Insulin er et peptidhormon og behandles som andre proteiner i fordøyelseskanalen, og brytes ned til enkle aminosyrer. All insulinaktiviteten blir da borte. Det har vært forsket på å utvikle en metode for å beskytte insulinet i fordøyelseskanalen så det kan tas peroralt, men ingen metoder har så langt ført frem til klinisk bruk. I stedet gis insulin vanligvis som injeksjon under huden.

2.2.3 Pankreas

Pankreas (bukspyttkjertelen) består av en liten endokrin del (ca 2 % av bukspyttkjertelens totale masse) og en stor eksokrin del. Den endokrine delen står for utskillelse av blant annet hormonene insulin (som produseres i betacellene) og glukagon (som produseres i alfacellene).

Den eksokrine delen står for utskillelse av blant annet mange enzymer som er nødvendig for nedbryting av fett, karbohydrater og proteiner med mer.

I den endokrine delen av pankreas finner vi de Langerhanske øyer, også kalt øyceller eller ”islets”. De Langerhanske øyene er populært sagt små miniorganer med egen blodforsyning og nerveforsyning, omsluttet av en kapsel, inne i pankreas. Det er mange ulike celletyper i en Langerhansk øy, og ca 60 % av cellene er insulinproduserende betaceller (se figur 2).



Figur 2
Bilde av en Langerhansk øy

På figuren ser man at de insulinproduserende betacellene er konsentrert i midten av øycellen, mens glukagon, somatostatin og PP-celler (pankreatiske polypeptid-celler) er lokalisert mot periferien (12).

En Langerhansk øy er ca 200 μm i diameter, og i en pankreas er det ca 1 million av disse.

Vanlig utbytte med dagens høsteteknikk til transplantasjon er ca 1/3 av dette, rundt 300.000 celleøyer. Mengden celler som trengs til en vellykket transplantasjon (vellykket brukes i dette tilfellet om transplantasjon som fører til insulinfrihet), overstiger som regel det antallet man får ut av én donors pankreas. Flere bukspyttkjertler trengs som regel til hver transplantasjon. Dette er et problem, da det medfører behov for langt flere donorer enn det som er tilgjengelig. Nye øyceller kan eventuelt transplanteres inn på et senere tidspunkt.

2.3 Transplantasjon av øyceller

Selv med hyppige blodsukkermålinger og tilrettelagte behandlingsregimer, har enkelte pasienter problemer med å oppnå god kontroll på blodsukkeret. Dårlig regulert diabetes har en rekke uheldige langtidsvirkninger, og dette er noe av grunnen til at man har startet med transplantasjon av øyceller.

Transplantasjon av øyceller gjør det mulig å bedre den glykemiske kontrollen til en subgruppe pasienter med type 1-diabetes, som er plaget og hemmet av dårlig blodsukkerkontroll og episoder med hypoglykemi. Ett år etter transplantasjonene er 44 % av pasientene uavhengige av insulin og de har god glykemisk kontroll. Men av disse er det bare 31 % som fortsatt er uavhengige av insulin etter 2 år (dvs. totalt 14 % av de transplanterte) (3).

Under transplantasjonen injiseres øycelle-materialet fra donor inn i portåren til mottaker, og cellene slår seg ned i leveren. Øyene får nerve- og blodforsyning og starter insulinproduksjon som respons på svingninger i blodsukkeret. Øyene kan ikke bli transplantert inn i bukspyttkjertelen, fordi dette organet med alle sine eksokrine enzymer, er alt for utsatt for betennelse (4).

2.4 Rejeksjon

Uten immunsuppressiv behandling vil transplantatet som regel avstøtes (7).

Avstøtningsreaksjon (rejeksjon) er immunsystemets naturlige respons for å beskytte kroppen mot fremmede substanser.

Det som utløser en immunreaksjon hos mottager, er alloantigener på transplantatet. Alloantigener er makromolekyler, som regel proteiner, som varierer innen en art, dvs. at de kan være forskjellige for forskjellige individer. Det finnes svært mange alloantigener, og noen alloantigener utløser kraftige immunreaksjoner ved allotransplantasjon, eksempelvis MHC-molekylene ("Major Histocompatibility Complex"). MHC-molekyler finnes hos alle vertebrater, og de har forskjellige navn i forskjellige species. MHC-molekylene kalles hos mennesket HLA-molekyler ("Human Leucocyte Antigen") (7).

Det finnes mange ulike såkalte blodtypesystemer. De to mest kjente kalles ABO og rhesus. ABO-systemets blodtyper skriver seg fra variasjon i karbohydratkjeder som sitter festet til

membranen, mens rhesus-systemet er knyttet til variasjon i noen av de mange proteinene som sitter i membranen.

Donor velges ut fra grad av forlikelighet med mottaker. Det tas da hensyn til ABO-systemet, og ved nyretransplantasjon også HLA-forlikelighet. Det må foreligge en ABO-forlikelighet, men ikke nødvendigvis en ABO-identitet. Det vil si at man kan, for eksempel, transplantere fra en O-person til en A-person, men ikke fra A til O (mottakeren har da anti-A-antistoffer). Ved transplantasjon av øyceller tas det mest hensyn til ABO-forlikelighet, og ikke HLA-forlikelighet eller rhesus-systemet. Det betyr ikke at det ikke er ønskelig å også ta hensyn til HLA og rhesus-systemet, men slik det fungerer i dag med transplantasjon av øyceller, er dette ikke praktisk mulig. Mye tyder på at det også vil være en del å vinne på å foreta HLA-matching før en slik transplantasjon.

For å oppnå best mulig tilpasning mellom giver og mottaker, er alle pasienter som venter på en nekronyre (nyre fra avdød giver) i Norden, registrert i Scandiatransplant. Etter at donor av en nekronyre er HLA-typet, vil man prioritere de mottakere i registeret som passer best (7). Per dags dato finnes det ikke noe lignende system for transplantasjon av øyceller, men en kan tenke seg at dette vil bli etablert i fremtiden.

Immunforsvaret trenger litt tid for å reagere på det nye organet, og derfor er avstøtning uvanlig den første uken. Flest avstøtninger oppstår fra en til tre uker etter transplantasjonen. Etter to til tre uker avtar risikoen for avstøtning, og etter tre måneder er det en relativt sjelden foreteelse, dersom tilstrekkelig immunsuppressiv behandling opprettholdes (13).

Et stort problem ved transplantasjon av øyceller, ved siden av donormangel og isolasjonsproblemer, er det store svinnet av øyceller etter transplantasjonen. Man kunne ha tenkt seg at steroidene førte til en oppregulering av P-glykoprotein med påfølgende økt utpumping av immunsuppressiva. Dette igjen kunne ha ført til for lav intracellulær konsentrasjon og avstøtning. Man har imidlertid sett at svinnet av øyceller etter transplantasjon ikke er en vanlig avstøtningsreaksjon, så årsaken til tapet er derfor fortsatt ukjent.

En eventuell avstøtning blir i første omgang behandlet med store doser immundempende medisiner intravenøst. Det kan også bli aktuelt med endringer i de medisinene pasienten allerede får. Behandlingen er vellykket i de aller fleste tilfellene.

2.5 Immunsuppressiv behandling

Ved transplantasjoner er det nødvendig å hemme mottagerens immunsystem. En del immunsuppressiva, som for eksempel mykofenolat, er spesifikk i den grad at de kun undertrykker aktiverte lymfocytter. Det hadde vært ønskelig med enda mer spesifikk immunsuppresjon, slik at man kun undertrykker de lymfocytene som er aktivert mot det transplanterte organet, og ikke de andre lymfocytene som er aktivert ovenfor andre agens enn det transplanterte organ, slik som for eksempel virus. Dette er i dag ikke mulig, men det foregår en intens forskningsaktivitet for å nå dette målet (14).

Man må altså i dag ty til relativt uspesifikk immunsuppresjon hvor man undertrykker alle aktiverte lymfocytter, uavhengig av spesifisitet. Dette har uheldige bivirkninger i form av økt infeksjonstilbøyelighet, særlig overfor virus, og økt risiko for kreftutvikling (14).

Den immunsuppressive behandlingen ved organtransplantasjoner må være intensiv de første ukene etter en transplantasjon mens immunresponsen mot transplantatet er størst. Deretter kan man redusere til lavest mulig vedlikeholdsbehandling. Etter en transplantasjon av øyceller reduseres dosene med immunsuppressiva gradvis etter 1-3 måneder.

Behandlingen er en balansegang mellom for svak immunsuppresjon som gir økt rejeksjonsrisiko, og for kraftig immunsuppresjon som gir økt risiko for infeksjoner og malignitet. Behandlingen individualiseres og styres etter behandlingsprotokoller ved at doseringen av de fleste medikamentene justeres i henhold til målte medikamentkonsentrasjoner (15).

3. P-GLYKOPROTEIN

3.1 Funksjon og lokalisasjon

Genet som koder for P-glykoprotein er lokalisert til kromosom 7 (16). P-glykoprotein er en ABC-transportør (ATP-binding cassette (ABC) transporter). ABC-transportørene er en av de største familiene av membranbundne proteiner. De er involvert i transporten av en rekke molekyler, hovedsakelig hydrofobe nøytrale eller positivt ladede forbindelser. Disse proteinene transporterer substrater over cellemembranen mot en konsentrasjonsgradient, med ATP-hydrolyse som drivkraft (17), (18).

Mange immunsuppressiva, blant annet ciclosporin, takrolimus og sirolimus er substrater for P-glykoprotein. Både sirolimus og takrolimus benyttes ofte etter en øycelletransplantasjon.

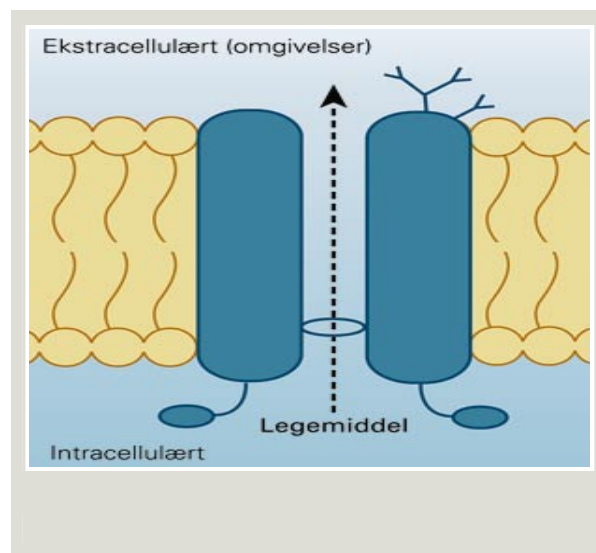
P-glykoprotein er utelukkende lokalisert i den delen av cellen som vender ut mot omgivelsene, for å beskytte mot potensielt toksiske fremmedstoffer, eksempelvis legemidler. Ekspresjonen av P-glykoprotein er høy i tarmvegg, galleganger og nyretubuli. Dette reflekterer den viktige rollen P-glykoprotein har i begrensning av systemisk legemiddeleksponering (og andre fremmedstoffer). Videre er P-glykoproteinnivået høyt i interne barrierer, slik som blod-hjerne-barrieren, blod-placenta-barrieren og blod-testis-barrieren, samt i ulike typer av immunceller (5),(19).

ABC-proteinene har viktige fysiologiske, farmakologiske og toksikologiske funksjoner som for eksempel transport av ioner, næringsstoffer, lipider, aminosyrer, peptider, proteiner, gallsalter, legemidler og giftige stoffer. P-glykoprotein fungerer som en pumpe, og virker derfor som en naturlig forsvarsmekanisme. Pumpen påvirker biotilgjengeligheten og distribusjonen av mange legemidler (17), (18).

Proteinet har mange ulike navn; P-glykoprotein (Pgp), MDR1 (multidrug resistance protein), *ABCB1* (ATP-binding cassette transporter), CLSC, PGY1, CD243 med mer, der de tre førstnevnte er de vanligste betegnelse. Det er per dags dato *ABCB1* som er det systematiske navnet (5).

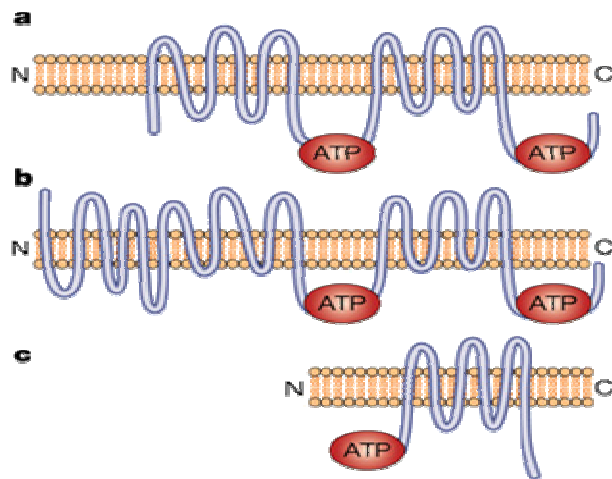
3.2 Struktur

P-glykoprotein er et protein med 12 transmembrane domener og 2 ATP-bindende regioner (figur 4). Begge disse er lokalisert intracellulært. P-glykoprotein er en fulltransportør.



Figur 3
Modell av P-glykoprotein.

P-glykoprotein som sitter i membranen, pumper stoffer, for eksempel legemidler, fra den intracellulære delen og ut til omgivelsene (5).



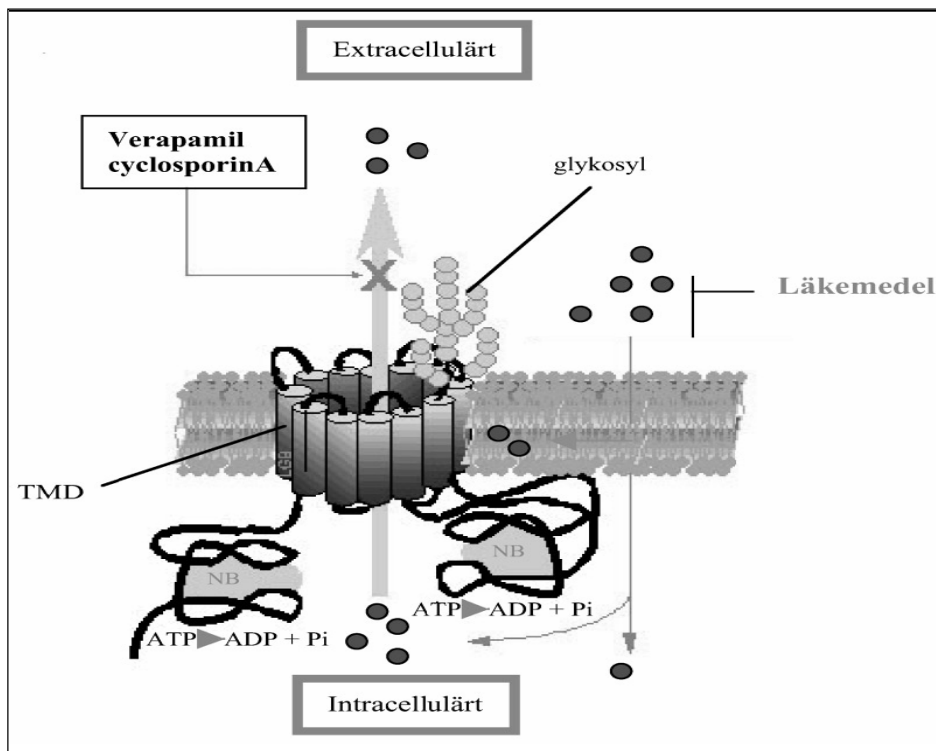
Figur 4
ABC-transportører.

Figuren viser strukturene til tre kategorier av ABC-transportører.

a *ABCB1*, P-glykoprotein (fulltransportør). Denne transportøren har 12 transmembrane domener og to ATP-bindende regioner.

b *ABCC2*, MRP1, 2, 3 og 6 (fulltransportør). Disse ligner *ABCB1* ved at de også har to ATP-bindende regioner, men de har et ekstra domene som består av fem transmembrane segmenter. Totalt har de 17 transmembrane domener.

c *ABCG2*, MXR (en halvtransportør). Denne halvtransportøren har kun én ATP-bindende region, og 6 transmembrane domener. Man tror at disse halvtransportørene må dimerisere for å fungere (20).



Figur 5
P-glykoproteinets struktur

Figuren viser strukturen til transportøren P-glykoprotein (*ABCB1*). Figuren viser de 12 transmembrane domenene, og intracellulært ser vi de to ATP-bindende regionene. Figuren viser hvordan legemidler som kommer seg inn gjennom membranen pumpes ut igjen, enten fra den intracellulære siden, eller fra membranen. (Verapamil og ciklosporin er hemmere av pumpen, og vil derfor hemme utpumpingen av legemidler via P-glykoprotein) (5).

3.3 Virkemåte

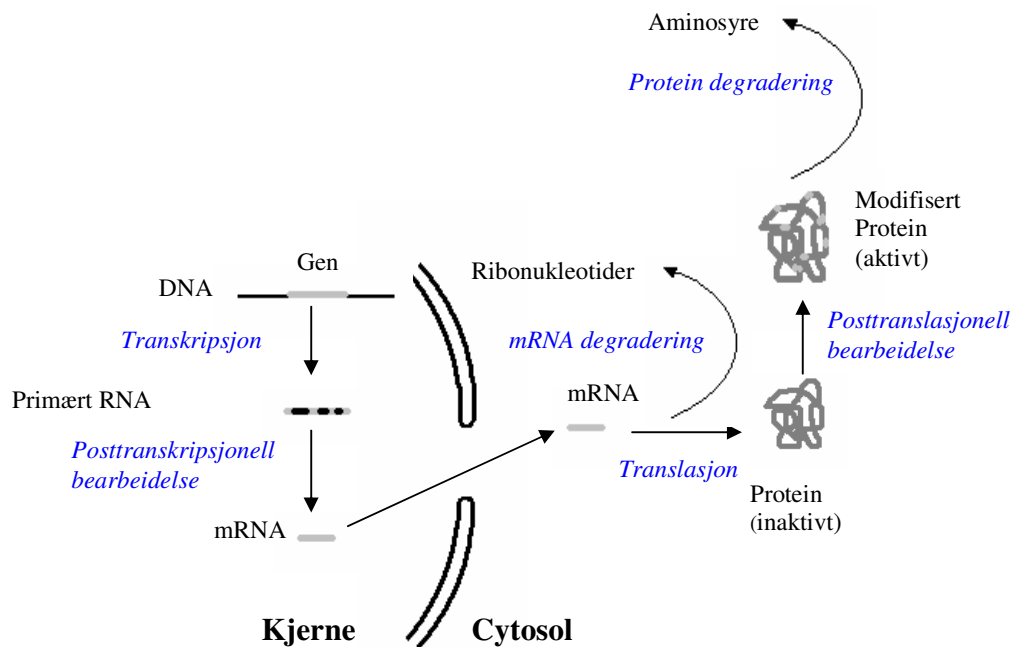
P-glykoprotein er et ATP-avhengig molekyl som skanner den indre membranen for lipider, legemidler osv, binder dem og "flipper" dem over til yttersiden av membranen. På den måten fungerer P-glykoprotein som en pumpe, som skuffer legemidler og andre stoffer ut av cellene og cellemembranen etter at de har kommet seg inn (18).

Et viktig trinn i transportsyklusen er koblingen av substratbinding og ATP-hydrolyse.

Substratene for P-glykoprotein bindes i en substratbindende lomme i grensesnittet mellom de transmembrane domenene av P-glykoprotein, og stimulerer ATPase-aktiviteten (21).

3.4 Reguleringspunkter

P-glykoprotein er et protein, og proteinuttrykket kan reguleres på samme måte som for andre proteiner. Det første trinnet som kan reguleres er transkripsjonen fra DNA til primært RNA. Neste trinn er bearbeidelsen fra primært RNA til mRNA. Det primære RNA-transkriptet inneholder både kodende (eksoner) og ikke-kodende (introner) sekvenser. Eksonene spleises ved en prosess der de ikke-kodende sekvensene kuttes ut, og det mRNA som forlater kjernen, inneholder således ikke introner. Under translasjonen (proteinsyntesen) blir nukleotidsekvensen i mRNA omgjort til aminosyresekvensen i et protein. Etter translasjon får vi dannet et inaktivt protein, som så gjøres om til et modifisert protein som er aktivt. Disse prosessene er også mulige reguleringspunkter. Andre reguleringspunkter er mRNA-degraderingen og proteindegraderingen.



Figur 6
Proteinsyntese.

Figuren viser dannelsen av proteiner, for eksempel P-glykoprotein. Mulige angrepspunkter i reguleringen av genekspressjonen er skrevet i kursiv.

3.5 Variasjon i genuttrykk; hemming og induksjon

ABC-transportproteinene endrer den intracellulære konsentrasjonen til en rekke terapeutisk brukte forbindelser og toksisk relevante agens (Hoffmann and Kroemer 669-701).

Store mengde P-glykoprotein i apikal membran i enterocytter (tarmceller) vil føre til redusert absorpsjon av legemidler, og store mengder P-glykoprotein i biologiske barrierer vil påvirke distribusjonen ved å redusere fordelingen av legemidlene. P-glykoprotein vil også påvirke eliminasjon av legemidler via lever og nyrer, der store mengder av proteinet vil øke eliminasjonen.

Mange legemidler har evnen til å hemme eller indusere P-glykoproteinkapasiteten, og mange legemidler er substrater for P-glykoprotein. Hemmere og induktorer vil kunne påvirke systemisk eksponering av legemidler som er substrater for P-glykoprotein gjennom å endre opptak og eliminasjon av legemidlene. De vil derfor endre biotilgjengeligheten til legemidler som er substrater for P-glykoprotein, og de kan gi opphav til klinisk relevante legemiddelinteraksjoner. Disse interaksjonene kan unngås eller håndteres ved oppmerksom bruk av hemmere eller induktorer sammen med P-glykoproteinsubstrater. Lokal tilgjengelighet i sentralnervesystemet, og andre vev som uttrykker P-glykoprotein, vil også påvirkes av hemmere og induktorer (5), (22). Noen legemidler, for eksempel steroider, kan også påvirke nivåene av P-glykoprotein ved å endre gentranskripsjonen.

Tabell 1**Substrater, hemmere og induktorer av P-glykoprotein.**

Tabellen viser eksempler på antiinfektiva og immunmodulerende midler som er beskrevet som substrater, hemmere og/eller induktorer av P-glykoprotein. ¹ Omtale som kombinert hemmer og induktor, skyldes trolig en akutt hemmende effekt og en induktoreffekt over tid (5).

Legemidler	Substrat	Hemmer	Induktor
<i>Antiinfektiva</i>			
Amprenavir	✓		✓
Erytromycin	✓	✓	
Indinavir ¹	✓	✓	✓
Itrakonazol	✓	✓	
Ketokonazol		✓	
Klaritromycin		✓	
Meflokin	✓	✓	
Nelfinavir ¹	✓	✓	✓
Rifampicin	✓		✓
Ritonavir ¹	✓	✓	✓
Saquinavir ¹	✓	✓	✓
Tetrasyklin	✓		
<i>Immunmodulerende midler</i>			
Ciklosporin	✓	✓	
Deksametason	✓		✓
Metylprednisolon	✓		
Sirolimus	✓	✓	
Takrolimus	✓	✓	

3.6 Polymorfismer

Som for det kjente enzymet CYP3A4, varierer også *nivåene* av P-glykoprotein mye mellom individer. I tillegg kan det finnes variasjoner mellom individer i transportproteinets *aktivitet*. Variabel P-glykoproteinkapasitet er en årsak til at ulike pasienter får ulik effekt eller ulike bivirkninger av standard behandling med legemidler som er P-glykoproteinsubstrater. En faktor som bidrar til ulik aktivitet og/eller mengde av P-glykoprotein, er SNPs (Single nucleotide polymorphisms). SNP-er er, enkelt sagt, posisjoner i genomet, der noen individer har et nukleotid med en base (for eksempel G) som avviker fra den basen andre individer har (for eksempel C).

I det humane genomet er det minst 1,42 millioner SNP, og i genet som koder for P-glykoprotein, er det karakterisert om lag 50 ulike mutasjoner.

De vanligste polymorfismene i genet som koder for P-glykoprotein, er i:

Ekson 12: C1236T

Ekson 21: G2677T/A

Ekson 26: C3435T

Frekvensen til de ulike polymorfismene varierer i ulike populasjoner, og noen av polymorfismene er assosiert med endret aktivitet hos P-glykoprotein(23), (24).

Primerne som brukes i denne PCR-reaksjonen, hybridiserer til ekson 21 og 22, og amplifiserer et område som inkluderer den nevnte polymorfismen i ekson 21. For å få detektert alle mulige varianter i posisjon 2677, ble det valgt å bruke flere prober.

4. BAKGRUNN FOR GENEKSPRESJONSANALYSE

Den kodende sekvensen av genene utgjør om lag en prosent av totalt DNA i det humane genom. Det estimeres nå at mennesket har under 30 000 gener (25).

Alle kjerneholdige celler i en flercellet organisme har samme arvemateriale. Det som gjør at cellene har ulike funksjoner, er forskjellen i hvordan genene blir regulert og uttrykt i hver celle. Initieringen av mRNA-transkripsjonen er et av de viktigste punktene i reguleringen av gener.

Genet som koder for proteinet P-glykoprotein, er lokalisert til kromosom 7. Ved hjelp av sanntids PCR som kvantitativt måler mengde P-glykoprotein mRNA, kan vi si noe om hvordan uttrykket av P-glykoprotein endres etter ulike tilsetninger i inkubasjonsmediet til cellene. I denne oppgaven brukes øyceller, og tilsetningsstoffet er metylprednisolon.

5. ETABLERING AV METODEN

Etablering av en metode for kvantitativ bestemmelse av mRNA-uttrykk av P-glykoprotein, var nødvendig for å kunne utføre denne oppgaven. Metoden som ble etablert, kan også brukes senere ved eventuelle videre studier som involverer P-glykoprotein. Under metodeopparbeidelsen bygget man på erfaringer fra etableringen av en metode for måling av IMPDH type I og II-ekspresjon i blodceller (26). Denne metoden ble etablert høsten 2004.

Sanntids-PCR ble benyttet for å bestemme mengden av mRNA for P-glykoprotein i øyceller. Produktene analyseres da underveis i amplifiseringen, og kurven sammenlignes med en standardkurve, slik at mengden mRNA i startmaterialet kan bestemmes. LightCycler 2.0 System fra Roche ble benyttet til dette. Til pipettering over i LightCycler-kapillærer, ble det brukt en pipetteringsrobot (MagNa Pure LC) for å unngå forurensninger.

Øycelle-materialet som ble analysert, kom fra 6 donorer. Øycellene ble eksponert for metylprednisolon i 0, 100, 500 og 1000 µg/ml i 48 timer. Alle øyceller hadde vært inkubert i medier tilsatt nikotinamid. Total-RNA ble isolert og cDNA ble fremstilt ved revers transkripsjon.

Prøvene ble fortynnet 1/10 med MS2-RNA-vann (totalkonsentrasjonen med MS2-RNA ble 10 µg/ml i prøvene, noe som har vist seg å være optimal konsentrasjon) før de ble blandet med de aktuelle mastermiksen og analysert.

Før analysen av øycellene startet, hadde metoden blitt optimalisert med hensyn til PCR-parametere som annealingtemperatur, denatureringstid, annealingstid og elongeringstid, og med hensyn til innholdet i mastermiksen, som konsentrasjonene av magnesiumklorid, primere og prober (se 5.7 Optimalisering av metoden). Det ble lagd standardkurve ut fra prøver der konsentrasjonen (antall templat per ml) var kjent (se 5.8 Standardkurve).

5.1 Polymerasekjedereaksjon

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en sensitiv metode for deteksjon av nukleinsyrer ved enzymatisk amplifisering av en utvalgt DNA-sekvens. Det er en metode for å amplifisere (lage mange kopier av) en bestemt DNA-sekvens uten bruk av levende organismer.

Teknikken kan brukes til å lage store mengder av relativt korte DNA-sekvenser, som for eksempel et gen eller en del av et gen. Nødvendige reagenser er DNA-templat, to primere som

avgrenser området som skal amplifiseres, DNA-polymerase (enzym som kopierer et DNA-templat i 5'-3' retning i gjentatte runder med replikasjon), og nukleotider (dNTP). DNA-polymerasen må ha et lite område dobbelttrådet DNA for å starte syntese av en komplementær DNA-kopi. Spesifikke primere sørger for det. Primerne bestemmer på den måten hvilket område som blir amplifisert. Teoretisk får man en dobling av det aktuelle DNA-området for hver syklus. Det gir 2^n kopier etter n cykler. 1 DNA-tråd kan således gi opphav til 1 milliard kopier etter 30 PCR-cykler.

Gangen i PCR:

1. Høy temperatur (94-95 °C): Denaturering, det dannes enkelttråder (høy temperatur bryter hydrogenbindingene mellom nukleotidene i spiralen).
2. Lavere temperatur: Primere hybridiserer (bindes) til hver sin tråd. For at primerne skal feste seg, må temperaturen i dette trinnet være under smeltepunktet. Smeltepunktet varierer med lengden og sammensetningen av primeren, slik at lange primere med høyt GC-innhold har høyt smeltepunkt. Smeltetemperaturen må kalkuleres for hver enkelt primer, og ligger vanligvis i området 55-65 °C.
3. Temperatur økes til 70-72 °C, som er optimal temperatur for DNA-polymerasen som brukes. Den lager komplementære kopier av templattrådene. Polymeriseringen starter med utgangspunkt i en primer som har festet seg til enkelttrådet DNA.
4. Syklisk gjentakelse av prosessen: Hvis man skal slippe å tilsette ny polymerase for hvert polymeriseringstrinn, må det brukes et enzym som tåler den høye temperaturen som er nødvendig for å denaturere DNA-dobbeltstrengene. Det brukes derfor en varmestabil DNA-polymerase, oftest fra bakterien *Thermus aquaticus* (Taq-polymerase). Denne polymerasen kan modifiseres kjemisk slik at den er inaktiv i romtemperatur, men blir aktivert ved høye temperaturer. Det gjør den mer anvendelig i bruk.

5.2 Revers transkriptase-PCR (RT-PCR)

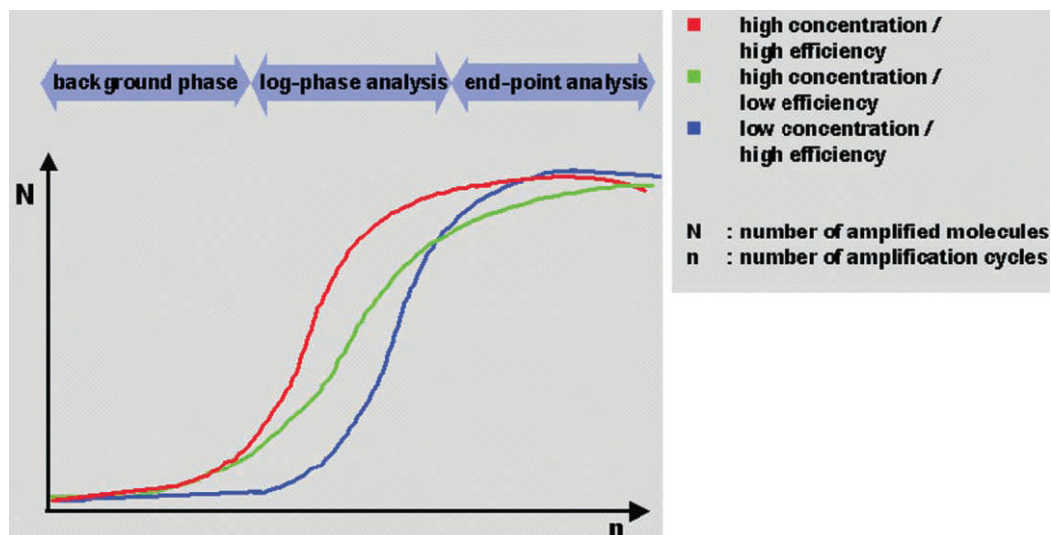
Revers transkriptase-polymerasekjedereaksjon forkortes ofte RT-PCR.

Reaksjonen starter da med en revers transkripsjon av isolert RNA til cDNA, som så fungerer som templat i en amplifiseringsreaksjon. Dette kan gjennomføres enten som en ett- eller to-trinns prosess. To-trinnsprosessen gir oftest beste resultat, fordi man kan optimalisere

revers transkripsjon og PCR hver for seg. En ett-trinns RT-PCR er derimot enklere å gjennomføre dersom man klarer å gjøre den tilstrekkelig robust og effektiv.

5.3 Sanntids-PCR

Sanntids-PCR kalles også real time-PCR eller kinetisk PCR. Dette er en form for PCR hvor produktene analyseres underveis i amplifisering, og det er denne formen for PCR som brukes under disse forsøkene. En probe bindes da til produktet i PCR-reaksjonen og fluorescerer når PCR-produktet amplifiseres. Fluorescensen leses av spektrofluorometrisk for hver syklus. Antall sykluser som skal til før det er påviselige mengder produkt (eller fluorescens) i prøven, er et uttrykk for hvor stor mengde templat som i utgangspunktet var i prøven.



Figur 7
Amplifikasjonskurver

Denne figuren viser typiske PCR-amplifikasjonskurver. Y-aksen angir fluorescensen som et mål på antall amplifiserte molekyler. X-aksen angir antall amplifikasjonssykluser (27).

Som figuren over viser, har hver kurve tre segmenter:

- En tidlig bakgrunnsfase
- En fase med eksponentiell vekst (log fase), der $N = N_0 * (E_{konst.})^n$
- En platåfase

Bakgrunnsfasen varer til fluorescens-signalet fra PCR-produktet er større enn bakgrunnsfluorescensen til probesystemet. Fasen med eksponentiell vekst begynner når det er dannet nok produkt til deteksjon over bakgrunnsfluorescensen. Fasen med eksponentiell vekst slutter når reaksjonseffektiviteten begynner å falle, dvs. ved overgang til platåfasen.

I motsetning til analyser i platåfasen kan analyser i logfasen gi nøyaktige data for antallet templatmolekyler. En økning i signal under logfasen korresponderer direkte med økning i PCR-produkt. Fordi amplifikasjonseffektiviteten er konstant gjennom analysen, kan mengde startmateriale bestemmes presist (27).

Som ved mange andre analysemetoder, er det også noen feilkilder ved PCR. Det er derfor viktig å få en bekreftelse på at det er riktig produkt som er dannet. Dette gjøres ved for eksempel å foreta en smeltepunktsanalyse. Ulike DNA-sekvenser har ulikt smeltepunkt avhengig av basesammensetning og produktlengde. Smeltepunktet defineres som temperaturen hvor 50 % av DNA-produktet er enkelttrådet og 50 % er dobbeltrådet. Formen og den kjemiske strukturen til basene gjør at det bare dannes hydrogenbindinger effektivt mellom A (adenin) og T (tymin), og mellom G (guanin) og C (cytosin). To hydrogenbindinger dannes mellom A og T, mens det dannes tre mellom G og C. Bindingene mellom G og C er derfor sterkere, og sekvenser med mye GC-bindinger vil derfor ha et høyere smeltepunkt enn AT-rike sekvenser (28).

For å kontrollere at det var riktig gen som ble amplifisert, ble det foretatt en analyse av produktet etter PCR-kjøringen. Kjøringen foregikk på vanlig måte, men uten prober. Målet med denne kjøringen var ikke å få detektert noe, men kun å få amplifisert store mengder av produktet. Dette ble så, *etter* PCR, pipettert over *fra* LightCycler-kapillærene *til* et 0,5 ml rør og tatt vare på for sekvensering. Sekvenseringsreaksjonen ble foretatt her på laboratoriet, men den kapillære elektroforesen av sekvenseringsproduktene ble utført på Medisinsk genetisk laboratorium.

Aktuelle feilkilder ved sanntids-PCR:

- Unøyaktighet: Ved DNA-polymerisering kan feil base komme inn. Dette er sjelden et problem, for tilfeldige feil introduseres på tilfeldige steder og ”drukner” når summen av alle PCR-produktene vurderes.

- Falsk negativ: Hvis man ikke får dannet noe DNA-produkt, kan det skyldes at det ikke er noe templat til stede, men det kan også ha tekniske årsaker som at primerne som er valgt, ikke er egnede, eller at reaksjonsbetingelsene er uhensiktsmessige.
- Falsk positiv: Hvis primerne ikke er spesifikke nok, kan de hybridisere flere steder langs DNA-templatet, noe som kan gi uønskede DNA-produkter. Alternativt kan prøven være forurensset med DNA eller PCR-produkter fra andre prøver.

5.4 Primere og prober

Egnetheten til primerne og probene ble undersøkt. Primerne bør være så spesifikke som mulig for å hindre dannelse av uønsket produkt. Primerne binder til en spesifikk sekvens i genet. Der primerne binder blir det dannet en dobbeltråd, noe som er nødvendig for at DNA-polymerasen skal binde seg og kopiere templatstrengen.

Primerne *ABCB1-1* (ekson 21) og *ABCB1-2* (ekson 22) er hentet fra litteraturen (29). Primerne bindes slik at man amplifiserer et område som inkluderer polymorfismen i ekson 21.

Probene er valgt ved hjelp av LightCycler Primers and Probes Design Software (LC PDS), som ble programmert til å finne prober som var forenlige med de oppgitte primerne.

BLAST-søk (Basic Local Alignment Search Tool via Tools-verktøyet i LC PDS) viser at begge primerne er spesifikke for *ABCB1*.

Prober brukes for å kunne detektere produktet som dannes når man kjører sanntids-PCR.

Sanntids-PCR er en PCR-metode der produktene analyseres underveis i amplifiseringen.

Prober er molekyler som fluorescerer når de bindes til PCR-produktene. Når man tilsetter prober, kan man se resultatene ved hjelp av fluorescensmålinger underveis.

Hybridiseringsprobene er sekvensspesifikke. Probene er enkelttrådede oligonukleotider, som er komplementære til en av trådene i amplikonet. I LightCycler-instrumentet brukes to prober, en som donerer energi, og en som absorberer energi og som så sender denne ut i form av lys. Intensiteten til lyset som emitteres, er proporsjonal med antallet produserte DNA-kopier, og måles ved enten 640 nm eller 750 nm. Fluorescenssignalet er avhengig av at begge probene bindes meget nært inntil hverandre.

Fordi polymorfismen i ekson 21 er inkludert i PCR-produktet som genereres, er det betryggende å bruke tre prober, en akseptorprobe, og to ulike donorprober. Akseptorproben bindes utenfor polymorfismeposisjonen og er derfor upåvirket av denne. Bindingen av donorprobene avhenger derimot av hvilke(n) polymorfisme(r) som er tilstede. Den ene donorproben (*ABCB1*-LC2) bindes perfekt til den hyppigste polymorfismen (2677G), mens den andre donorproben (*ABCB1*-LC1) bindes perfekt til den nest hyppigste polymorfismen (T). Begge donorprobene vil også kunne binde seg til den sjeldne A-polymorfismen. Spesielt vil proben for G-polymorfismen bindes godt. Uavhengig av hvilken polymorfisme det er i 2677-posisjonen, vil ekspresjonen derfor påvises med de nevnte probene. Man kan senere, ved hjelp av smeltepunktanalyser, få informasjon om genotypen hvis det er ønskelig. Binding som gir mismatch, vil gi lavere smeltepunkt enn en perfekt binding. Smeltepunktet vil også være avhengig av om vi har materiale fra en som er homozygot, eller en som er heterozygot.

PCR-primere:

ABCB1-1: CCCATCATTGCAATAGCAGG

ABCB1-2: TGTTCAAACTTCTGCTCCTGA

LightCycler-prober:

ABCB1-LC1: GAACTAGAAGGTTTCTGGGAAGATCGC-Fluorescein (893 Ser, 2677T)
(Donorprobe)

ABCB1-LC2: GAACTAGAAGGTTGCTGGGAAGATCGC-Fluorescein (893 Ala, 2677G)
(Donorprobe)

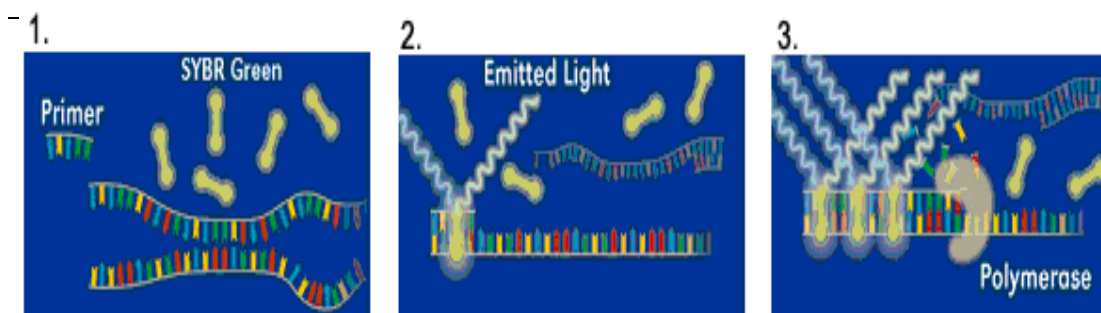
ABCB1-LC3: LC640-CTGAAGCAATAGAAAACCTCCGAACCGTTGTTT-phosphate
(Akseptorprobe)

For å teste ut primerne og probene, ble det brukt ulike konsentrasjoner av $MgCl_2$ (DNA-polymerasen trenger $MgCl_2$ for å være aktiv), ulike annealingtemperaturer (ønskelig med så høy temperatur at amplifikasjonen er spesifikk uten at temperaturen blir så høy at effektiviteten faller), og det ble brukt SYBR Green I i stedet for prober (for å se om det ble dannet uspesifikt produkt). Det ble også prøvd med SYBR Green I og prober samtidig, for å se om probene i seg selv ga opphav til uspesifikt produkt. Det ble da prøvd ved laveste

aktuelle temperatur (55 °C), fordi det er ved lav temperatur at det mest sannsynlig kan bli dannet uspesifikke produkter.

5.5 SYBR Green I

SYBR Green I er et fargemolekyl som bindes til alt dobbelttrådet DNA. Bindingen gjør at fluorescensen til molekylet øker mer enn 100 ganger. Når PCR-produkt-mengden øker, vil også fluorescensen øke (30). SYBR Green I bindes til alt dobbelttrådet DNA, og vil derfor også gi signal fra uspesifikke produkter og primer-dimere, i tillegg til det spesifikke produktet. Dette kan utnyttes til deteksjon av uspesifikke produkter ved at det i etterkant av PCR gjøres en smeltekurveanalyse på produktene. De ulike produktene og primer-dimerene har forskjellig smeltepunkt. Det er dokumentert at høye mengder av primer-dimere kan influere på amplifikasjonen. Av den grunn bør reaksjonen optimaliseres før kvantifiseringen (27). Ved bruk av prober til deteksjon får vi ikke detektert primer-dimere. Det er derfor nødvendig å bruke SYBR Green I i en tidlig fase av metodeopparbeidelsen, slik at man eventuelt kan utelukke primer-dimere.



Figur 8
SYBR Green I.

Figuren viser hvordan SYBR Green I virker under PCR-kjøringen.

1. I starten av amplifikasjonen vil reaksjonsblandingen inneholde denaturert DNA, primerne og fargestoffet. De ubundne fargestoff-molekylene fluorescerer svakt, og produserer et minimalt bakgrunnsfluorescens-signal. Dette trekkes fra i dataanalysen.
2. Etter at primerne har festet seg, kan noen få fargestoffmolekyler binde seg til dobbelttråden. DNA-binding fører til en dramatisk økning i SYBR Green I- molekylene evne til å emitte lys etter eksitasjon.
3. Under elongeringen fester flere og flere fargestoffmolekyler seg til den nysyntetiserte DNA-tråden, og hvis reaksjonen blir monitorert kontinuerlig, ser man en økning i fluorescens i sann-tid. Ved denaturering av DNA før neste syklus, frigis fargestoffmolekylene og fluorescenssignalet faller (30).

5.6 Husholdningsgener

Husholdningsgener er gener som er aktive i mange typer celler, og som koder for proteiner som har funksjoner som er essensielle for cellefunksjonen. Ideelt sett bør de ikke reguleres eller påvirkes av eksperiment-prosedyren. I denne oppgaven ønskes derfor husholdningsgener som *ikke* - eller i liten grad - reguleres av steroider.

mRNA fra husholdningsgenene er til stede sammen med mRNA fra P-glykoprotein under hele prosessen. Husholdningsgenene kan dermed være med på å korrigere for variasjon i RNA-mengde grunnet ulike mengder prøvemateriale, ulik kvalitet på prøvene (for eksempel redusert nukleinsyre kvalitet grunnet degradering), ulikt utbytte ved isolering, forskjeller i utbytte ved revers transkripsjon, og annen variasjon i opparbeidelsen (for eksempel pipettevariasjon). Husholdningsgenene vil også kompensere for en eventuell tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøvematerialet (31).

Det ble benyttet tre husholdningsgener i alle forsøkene. Disse var på forhånd prøvd ut og benyttet i tidligere forsøk gjort på laboratoriet. Husholdningsgenene kom fra et kit fra Roche, som inneholdt ferdig blandede løsninger med primere og prober designet for å detektere de aktuelle husholdningsgenene. Husholdningsgenene som ble brukt, var β_2 -mikroglobulin (β_2M), glukose-6-fosfat dehydrogenase (G6PDH) og 5-aminolevulinat-syntase (ALAS). For å redusere sannsynligheten for koregulering av referansegenene, bør det ideelt sett brukes husholdningsgener fra ulike klasser (31). I dette forsøket ble det benyttet husholdningsgener fra to ulike klasser. 5-aminolevulinat-syntase og glukose-6-fosfat dehydrogenase regnes som metabolismerelaterte gener. β_2 -mikroglobulin er vanligvis kompleksbundet med en α -kjede, og dette komplekset utgjør HLA klasse I-molekylet. β_2 -mikroglobulin er således mer struktureltert.

5.7 Optimalisering av metoden

Reaksjonen måtte optimaliseres for at den skulle bli mest mulig effektiv og spesifikk. Cp-verdi og smeltepunktsanalyse ble brukt for å vurdere de ulike parameterene opp mot hverandre.

5.7.1 $MgCl_2$

DNA-polymerasen krever magnesiumklorid for å være aktiv. $MgCl_2$ -konsentrasjonen ble optimalisert ved å amplifisere mål-genet i nærvær av ulike konsentrasjoner av $MgCl_2$. Det ble

da prøvd med konsentrasjoner i området 1- 5 mM. $MgCl_2$ -konsentrasjonen påvirker effektiviteten og spesifisiteten til amplifiseringsreaksjonen.

Når man optimaliserer $MgCl_2$ -konsentrasjonen bruker man SYBR Green I i stedet for prober. For høy konsentrasjon vil kunne føre til amplifisering av både spesifikke og uspesifikke produkter, mens for lav konsentrasjon vil kunne føre til for lav effektivitet.

5.7.2 Temperatur

Ved utprøving av optimal annealingtemperatur ble det prøvd ved både 55, 57, 59, og 61 °C. For lav temperatur kan gi opphav til uspesifikke produkter, fordi primerne kan binde seg uspesifikt. Jo strengere betingelsene er, desto mer spesifikk reaksjon og mer spesifikt produkt kan man få. Det er derfor ønskelig med så høy temperatur som mulig. Det er imidlertid viktig å huske på at for høy temperatur kan føre til lavere produktmengder, fordi primerne ikke klarer å binde seg til DNA-templatet. Dette er heller ikke ønskelig. Det er derfor nødvendig å prøve ulike temperaturer for å finne ut hva som er optimalt.

5.7.3 Primere

Lengden av PCR-produktet som primerne avgrenser bør ikke overstige 1000 basepar, og korte ampliconer anbefales for best resultat. Denne metoden har et PCR-produkt på 158 basepar. Det kan være en fordel å bruke HPLC-rensede primere, og dette ble brukt under alt arbeidet. Sekvenser som tillater dannelse av duplekser mellom primerpar, bør unngås (27).

Det ble prøvd med ulike forhold mellom primerne. Konsentrasjonsforholdene som ble prøvd ut, var i området 0.5/0.5 til 1/1. Oppsett som ble benyttet, var 0.5/0.5, 0.5/1, 1/0.5, og 1/1. Alle andre parametere ble holdt konstante under optimaliseringen av primer-konsentrasjonene.

5.7.4 Prober

Man bør bruke HPLC-rensede prober og unngå sekvenser som tillater dannelse av duplekser mellom probepar (27).

Det ble prøvd med ulike konsentrasjonsforhold mellom donorprobe og akseptorprobe. Konsentrasjonsforholdene som ble testet, var i området 0.15/0.15 til 0.3/0.3. Oppsettet som ble benyttet, var 0.15/0.15, 0.15/0.3, 0.3/0.15, og 0.3/0.3 (donorprobe mot akseptorprobe).

Alle andre parametere ble holdt konstante under optimaliseringen av probe-konsentrasjonene.

5.8 Standardkurve

Standardkurve lages fordi det er ønskelig å få en kvantifisering av konsentrasjonene av P-glykoprotein-cDNA.

LightCycler sammenligner amplifikasjonen av mål-nukleinsyre i den ukjente prøven med en standardkurve som er lagd med kjente konsentrasjoner av de samme nukleinsyrene.

Konsentrasjonene som velges for standardkurven, bør være innenfor det konsentrasjonsområdet der en forventer at prøveresultatene kommer til å ligge. En typisk standardkurve settes opp ved å bruke minst fem konsentrasjoner. Disse lages ved hjelp av seriefortynning.

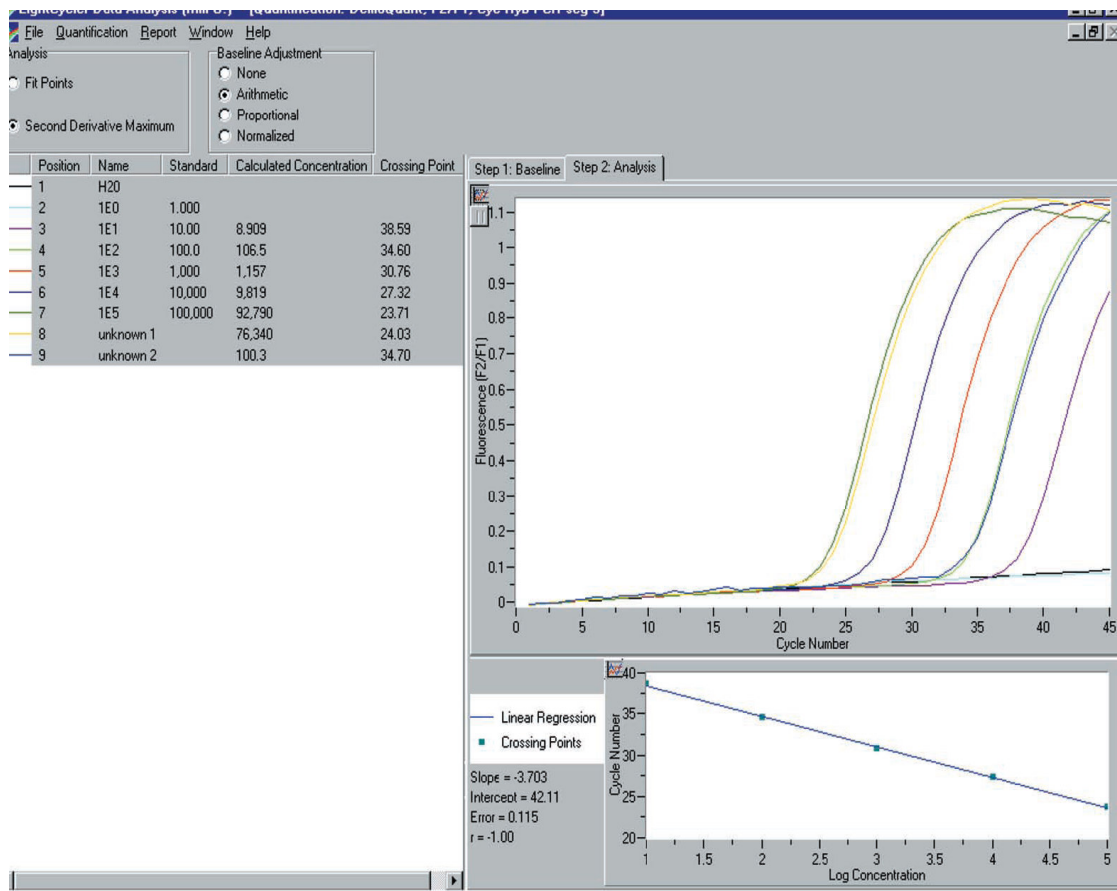
Standardkurven er en lineær regresjonslinje for standardløsningens "crossingpoint"-verdier (y-aksen) mot logaritmen til konsentrasjonen til prøvene (x-aksen). "Crossingpoint"-verdiene (= Cp-verdiene) er definert som det antall syklus hvor fluorescenssignalet for første gang overgår verdien til bakgrunnsstøyen. Cp-verdiene fra standarden brukes for å omgjøre Cp-verdiene til den ukjente, til konsentrasjoner. For at dette skal bli korrekt, er det viktig at amplifikasjonseffektiviteten til standarden og prøvene er identisk. Forskjell i effektivitet mellom prøve og standard kan gi store forskjeller i resultatet. Alle kvantitative PCR-metoder forutsetter at standarden og prøvene amplifiseres med identisk effektivitet.

Effektiviteten kan regnes ut ved å bruke stigningstallet til standardkurven (regresjonslinjen). Stigningstallet beskriver kinetikken til PCR-amplifikasjonen.

Effektiviteten regnes ut ved å bruke denne formelen:

$$E = 10^{-1/\text{stigningstall}}$$

Et stigningstall på 3,3 gir en effektivitet på 2, som er maksimal effektivitet.



Figur 9
Standardkurve.

Figuren viser en analyse på LightCycler for å få lagd standardkurve. En standardkurve lages som regel ved seriefortynning, og det er vanlig å bruke minst 5 konsentrasjoner. Målt Cp-verdi plottes mot logaritmen til den kjente utgangskonsentrasjonen. Effektiviteten til PCR-reaksjonen beregnes med utgangspunkt i stigningstallet til standardkurven. Stigningstallet til standardkurven (regresjonslinjen) beskriver effektiviteten av PCR-reaksjonen slik: $E = 10^{-1/\text{stigningstall}}$

5.8.1 Amplifisering av produkt, forberedelser til gelelektroforese

Standardkurven lages ved først å kjøre en PCR-reaksjon uten deteksjon (uten prober) der målet kun er å få amplifisert store mengder produkt. Mastermiksen til bruk ved amplifisering lages i sterilt miljø i LAF-benk. Det er svært viktig at dette skjer fysisk adskilt fra amplifisering og eventuelle analyser av PCR-produkt.

Mastermiksen består av vann, MgCl_2 (i optimalisert konsentrasjon 3,5 mM), primere (i optimalisert konsentrasjonsforhold 0.5/0.5) og "fast start" enzymsmik (kjemisk modifisert DNA-polymerase).

Produktet etter PCR-reaksjonen blir pipetert over fra LightCycler-kapillærene til et felles rør og fryst ned i en separat beholder.

5.8.2 Laging og støping av gel

Begge endene til formen teipes, og formen plasseres i vater i elektroforesekaret. 20 ml modifisert TAE-buffer (med 0,1 mM Na-EDTA i sluttløsningen) overføres til en 1 liters målekolbe, som så fylles opp med "Millipore-vann" til merket. "Millipore-vann" er nukleasefritt (nuklease er en enzymklasse som spalter nukleinsyrer). 0,6 gram 1,2 % SeaKem-agarose veies inn i en 250 mL Erlenmeyerkolbe, og 50 ml modifisert TAE-buffer tilsettes under lett risting. Vannstanden merkes av, og åpningen dekkes med plastfilm med små hull i. Agarosen løses opp i mikrobølgeovn. Den må ristes underveis for å unngå at det koker over. Vanntapet erstattes med nukleasefritt vann. Agaroseløsningen avkjøles under rennende vann før 1 dråpe etidiumbromid tilsettes. Løsningen kan ikke være for varm når etidiumbromid tilsettes, fordi etidiumbromid er flyktig, og det kan være carcinogent ved innånding. Agaroseløsningen helles over i formen, og en kam som lager brønner, plasseres i. Gelen avkjøles (i vater) i ca 1 time. Teipen fjernes og karet fylles med modifisert TAE-buffer slik at gelen dekkes. Kammen fjernes like før prøvepåsetting.

5.8.3 Rensing av PCR-produkt

Gelelektroforese

PCR-produktet og "loading buffer" (består av 25 mg bromfenolblått, 1,5 g Ficoll 400 og 10 ml nukleasefritt vann) blandes i forholdet 5:1. Ca 200 μL overføres til den lange brønnen på gelen. Markør nr. V blandes i tilsvarende forhold med "loading buffer", og 5 μL av denne blandingen tilsettes en av de smale brønnene ved siden av prøvebrønnen. Konstant spenning på 100 V settes på i ca 45 minutter.

Etter endt elektroforese vaskes gelen før den studeres i UV-lys. Gelen fotograferes, riktig bånd identifiseres og skjæres ut med skalpell. Gelen skal være kortest mulig tid i UV-lyset, da UV-bestrålingen kan gi endringer i DNA.

Overfører gelbiter i porsjoner på ca 100 mg til spin-kolonner (rør med filter som skiller produktet fra gelen ved kraftig sentrifugering).

Ekstraksjon fra gel

Spin-kolonnene sentrifugeres i 10 minutter ved 5000g og 20 °C. Produktet ligger da i bunnen av rørene. Filterholderen med gelen fjernes, og produktet samles i et rør. 5 µL av dette tas ut og overføres til en kyvette. Tilsetter 45 µL vann, slik at det totalt blir 50 µL i kyvetten. En blank lages ved å tilsette 50 µL vann til en annen kyvette.

5.8.4 Kvantitering av produkt

Kyvetten med blank-prøven brukes for å ”nullstille” UV-apparatet. Kyvetten med prøven settes inn, og konsentrasjonen i prøven bestemmes ved UV-absorbansmåling. Kjennskap til amplikonlengde og DNA-konsentrasjon gir antall templater per mL.

5.8.5 Fortynningsserie og standardkurve

Produktet brukes som utgangspunkt i en fortynningsserie som skal brukes for å lage standardkurve. Lager da fortynninger med 6 ulike konsentrasjoner. For hver fortynning blir det blandet og sentrifugert ned 3 ganger. Standardkurven ble generert i en egen LightCycler-kjøring, og senere importert inn i de ulike kjøringene. Det ble brukt 4 paralleller av de to svakeste fortynningene, 5 av den neste og 6 paralleller av de 3 siste og største fortynningene. Standardkurven dekker området 1,04E+06 transkripter/rør til 1,04E+01 transkripter/rør.

Fortynningsserien kjøres med mastermikser med begge probe-par for å se om det blir noen forskjell. Bruker optimaliserte primer- og probe-konsentrasjoner, optimalisert magnesiumklorid-konsentrasjon og optimal temperatur ved PCR'en.

6. RESULTATER

6.1 Etablering av metoden

En metode for kvantitativ bestemmelse av mRNA-uttrykk av P-glykoprotein i cellemateriale ble etablert. Den endelige metoden involverer flere teknikker, som blant annet isolering av mRNA, revers transkripsjon fra mRNA til cDNA, bruk av pipetteringsroboten MagNa Pure LC og sanntids-polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) på LightCycler-instrument fra Roche. Metoden fungerer i dag godt, og kan benyttes ved videre studier av P-glykoprotein.

6.1.1 Endelig metode

PCR-betingelser

Denatureringen skjer ved 95 °C i 10 sekunder. Amplifiseringen skjer ved en annealingstemperatur på 58 °C i 5 sekunder før temperaturen økes til 72 grader i 10 sekunder. Dette gjentas i 45 sykluser (se 8.6 Eksperimentprotokoll i appendiks).

Mastermiksblandinger

Konsentrasjon av primere, prober og MgCl₂ ble optimalisert, og det som fungerte best var MgCl₂-konsentrasjon på 3,5 mM, probe-konsentrasjonsforhold på 0.15/0.15 og primer-konsentrasjonsforhold på 0.5/0.5. Det var dette oppsettet som ble brukt under alle kjøringene med øyceller fra donor.

ABCB1**LC1 3,5**

MgCl2	
Konsentrasjon (mM)	Volum (µL)
3,5	2
1	0

Vann	7	224
MgCl2 25mM	2	64
Primer: ABCB1-1	1	32
Primer: ABCB1-2	1	32
Probe ABCB1-LC1	1	32
Probe ABCB1-LC3	1	32
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	-----------	-----------

ABCB1**LC2 3,5**

MgCl2	
Konsentrasjon (mM)	Volum (µL)
3,5	2
1	0

Vann	7	224
MgCl2 25mM	2	64
Primer: ABCB1-1	1	32
Primer: ABCB1-2	1	32
Probe ABCB1-LC2	1	32
Probe ABCB1-LC3	1	32
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	-----------	-----------

Husholdningsgen h-b2M

Vann	8,6	275,2
MgCl2 25mM	2,4	76,8
h-b2M	2	64
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	-----------	-----------

Husholdningsgen ALAS

Vann	8,6	275,2
MgCl2 25mM	2,4	76,8
ALAS	2	64
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	-----------	-----------

Husholdningsgen G6PDH

Vann	8,6	275,2
MgCl2 25mM	2,4	76,8
G6PDH	2	64
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	-----------	-----------

Løsningene ble blandet i den rekkefølgen de står skrevet.

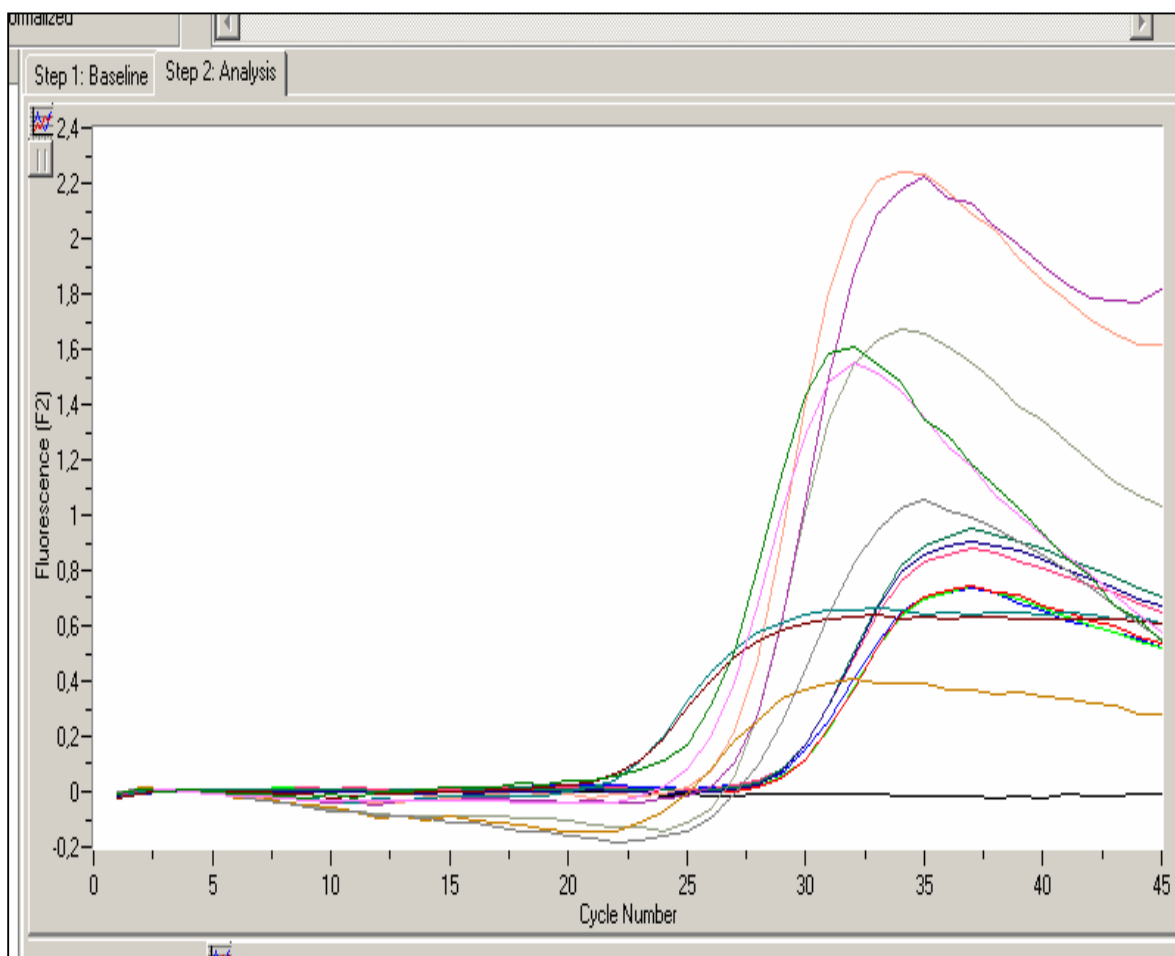
Prøvene ble først fortynnet 1/10 med MS2-RNA-vann.

Hver kjøring ble foretatt med prøvene som hadde blitt tilsatt aktuell mastermikser (har fem ulike mastermikser; 2 som skal detektere P-glykoprotein (2 stk grunnet SNP i ekson 21), og 3 mastermikser med husholdningsgenene), kalibrator, blank (mastermikser tilsatt vann i stedet for cDNA) og standard (det er én standard for hvert gen).

Blanding av mastermikserne skjer i eget avtrekk for å hindre forurensning av reagensene. Det benyttes hansker under hele prosedyren. Reagensene som brukes, inkludert vannet, er av PCR-kvalitet.

6.2 Påvisning av P-glykoprotein i øyceller

Etter at metoden var etablert ble det utført analyser for å se om det var mRNA fra P-glykoprotein i øyceller. Målet var å påvise P-glykoprotein. De Langerhanske øyene ble plukket fra medium med en 10 µL pipette under mikroskop på Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi. Disse kan skilles fra eksokrint vev ved at de er litt rundere og at de har en mer markert gulfarge. Øyene som ble plukket, ble straks lysert ved hjelp av buffer, og så fryst ned ved -70 °C. Total-RNA ble isolert ved hjelp av en metode utviklet av S.Bremer (26). Det ble utført revers transkripsjon etter prosedyre beskrevet i appendiks, og PCR ble utført på cDNA-et. Det ble kjørt med triplikater av alle fem mastermikser (en mastermikser med probepar LC1-LC3, en med probepar LC2-LC3, en med β_2 M, en med ALAS og en med G6PDH). En blank var med i alle kjøringene (det brukes da vann med PCR-kvalitet i stedet for cDNA i en prøve). Det ble da tydelig utslag på P-glykoprotein i det analyserte materialet. Blanken ble en rett linje, noe som tyder på at det ikke var forurensninger i materialet.



Figur 10
Påvisning av P-glykoprotein.

Påvisning av P-glykoprotein i øycelle-materiale.

Triplikatene kommer ikke så tett som de bør. Dette har antageligvis skjedd fordi blandingen av løsninger med husholdningsgenene har vært for dårlig etter at de var tatt ut av fryseren og så tint. Den sorte linjen er blank-prøven. Denne viser at det ikke er noen forurensninger i materialet.

6.3 P-glykoproteinvariasjon etter inkubering av øycelle-materiale med metylprednisolon

Etter påvisning av P-glykoprotein i øycelle-materiale var man interessert i å finne ut om ekspresjonen av P-glykoprotein endret seg etter inkubering i medium tilsatt ulike konsentrasjoner av metylprednisolon.

Til dette forsøket, der kvantitative ekspresjonsendringer skulle måles, ble øycellene plukket av personalet i "øycellegruppen". Øyene ble isolert fra pankreas fra 6 avdøde donorer. Cellene

ble inkubert i medium tilsatt ulike konsentrasjoner av metylprednisolon i 48 timer før total-RNA ble isolert. Konsentrasjonene med tilsatt metylprednisolon var 100, 500 og 1000 µg/mL. I tillegg var det en kontrollprøve for hver pankreas. Kontrollen ble ikke tilsatt metylprednisolon, men den ble inkubert i medium på samme måte som de andre cellene. Revers transkripsjon og ekstraksjon av cDNA fra disse prøvene, ble utført av personalet i ”øycellegruppen”. Alle prøvene var da isolert og revers transkribert etter samme prosedyre. Alt øycelle-materialet hadde blitt inkubert i medium tilsatt nikotinamid.

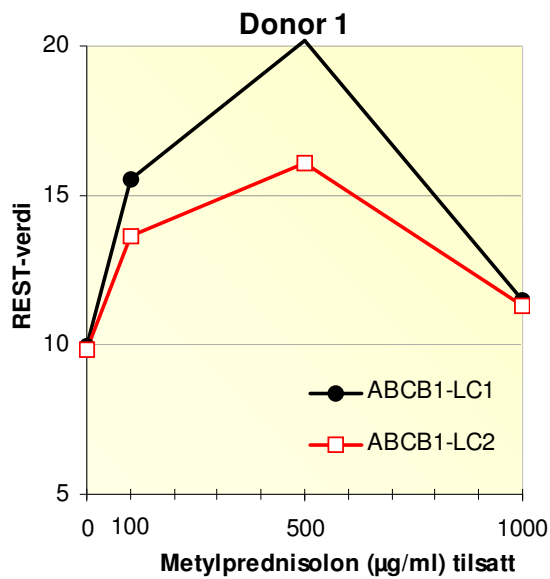
Etter innledende forsøk kunne man slå fast at øycelle-materialet burde fortynnes i forholdet 1/10 med vann tilsatt MS2-RNA, slik at endelig konsentrasjon med MS2-RNA ble 10 µg/ml. MS2-RNA reduserer bindingen av nukleinsyre til vegger i prøverør, pipettespisser og lignende ved at det er med på å mette overflatene. Det skal i tillegg også gi en stabilisering av nukleinsyrene.

De fortynnede prøvene ble så kjørt med alle de fem ulike mastermiksen (to for å detektere P-glykoprotein, og en til hver av de tre husholdningsgenene), alle i triplikater og med tilhørende standard (avhengig av genet som ble testet). Triplikat av kalibrator og en blank-prøve ble også tatt med i alle kjøringene. Kalibratoren var den samme for alle kjøringene til øycellene som kom fra samme pankreas. Kalibratoren korrigerer for forskjeller i deteksjonssensitivitet.

De resulterende Cp-verdiene ble plottet inn i REST-programmet (Relative Expression Software Tool= REST) (32). Dette programmet kalkulerer genreguleringen ved å bruke det geometriske snittet til de tre husholdningsgenene. Det er disse verdiene som blir brukt for å fremstille resultatene grafisk. REST-verdiene er på y-aksen, og konsentrasjonen metylprednisolon som ble tilsatt cellediet, er på x-aksen. Resultatet blir et plott med normalisert ratio.

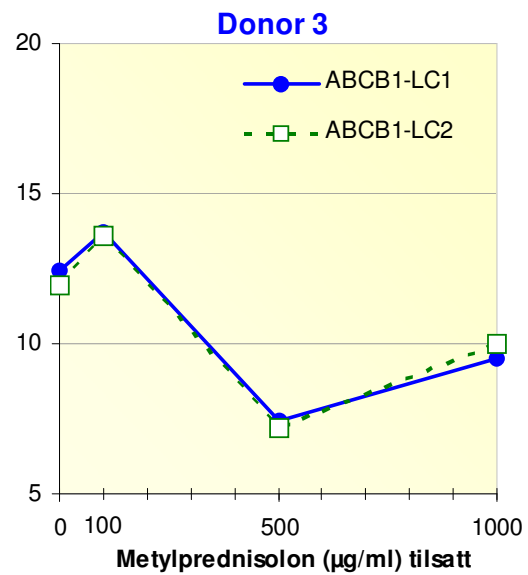
Resultatene som presenteres her, er fra de to øycelleprøvene med størst ulikhet i ekspresjon relatert til tilsatt metylprednisolon. I Appendix vises alle resultatene. Mulige årsaker til de forskjellige kurvene er drøftet under Diskusjon.

Figurene viser den relative genekspresjonsendringen mot tilsatt konsentrasjon av metylprednisolon i cellediet under inkuberingen av øycellene.



Figur 11. Relativ genekspressjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

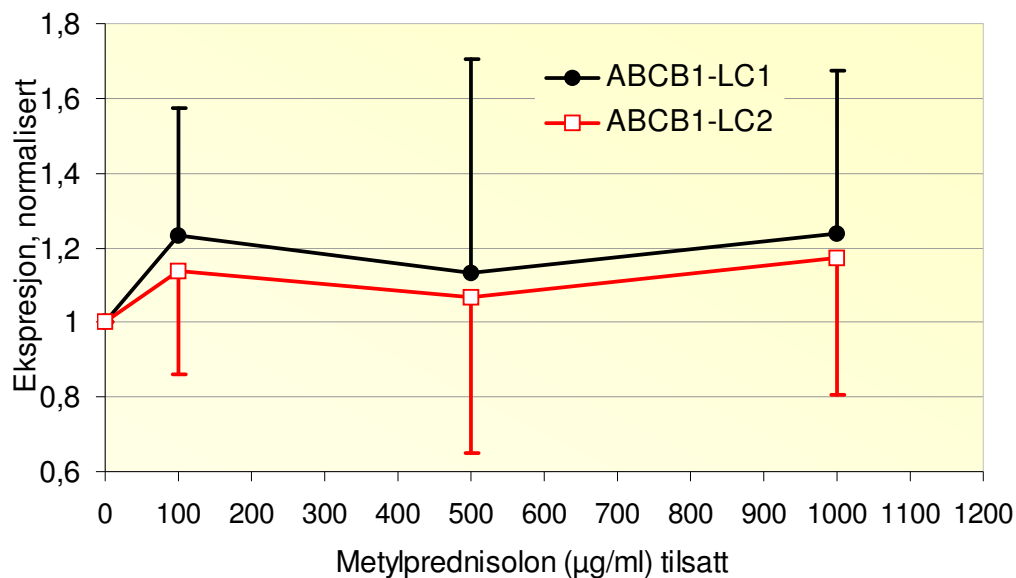
ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)



Figur 12. Relativ genekspressjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)

Det ble valgt å lage et plott der gjennomsnittet til alle resultatene ble brukt. Verdiene ble da justert for effektivitet og normalisert i henhold til utgangsverdien. Resultatet ble da som følger:



Figur 13

Ekspresjon av P-glykoprotein i øycelle-materiale inkubert med metylprednisolon.

Ekspresjon av P-glykoprotein (*ABCB1*) i øycelle-materiale isolert fra avdøde humane donorer (n=6). Median og standardavvik av *ABCB1* mRNA-mengde relativt til 3 husholdningsgener, justert for effektivitet og normalisert i henhold til utgangsverdien, er vist ved ulike metylprednisolon-konsentrasjoner. Verdier på x-aksen er metylprednisolon-konsentrasjon tilsatt mediet. Inkuberingstid er 48 timer.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til henholdsvis T- og G-polymorfismen (se 5.4).

7. DISKUSJON

Sanntids RT-PCR er en sensitiv metode som kan benyttes til kvantifisering av mRNA-ekspresjon i ulikt cellemateriale. Gjennom optimalisering av viktige trinn og parametere er det utviklet en metode for bestemmelse av ekspresjon av P-glykoprotein (*ABCB1*)-mRNA. Metoden er benyttet til første analyser av øycelle-materiale isolert fra humane nekro-bukspyttkjertler. Ved bruk av denne metoden ble det påvist *ABCB1*-mRNA i celleøyene.

Metoden ble også benyttet til analyse av celleøyer inkubert med metylprednisolon. Resultatene viser at ekspresjonen av *ABCB1*-mRNA varierer, trolig avhengig av ytre påvirkninger, som tid etter høsting av øycellene, immunsuppressiv påvirkning med mer. I tillegg varierer ekspresjonen mellom celleøy-populasjonene. Det er også mulig at ekspresjonen påvirkes av høydose-steroider.

7.1 Metoden

7.1.1 Prøveopparbeidelse

For å redusere faren for degradering av nukleinsyrer, ble det brukt rene hansker i alle tilfeller hvor RNA/DNA-løsninger, eller utstyr ble berørt. Utstyr til å ha prøver eller reagenser i var sterilt og nukleasefritt. Samme prosedyre ble benyttet hver gang, og reagensene ble blandet i samme rekkefølge ved hver analyse.

Prøveopparbeidelse og analyser som ble gjort før og etter PCR, ble utført i forskjellige lokaler, først og fremst for å hindre kontaminasjon fra tidligere PCR-produkter.

7.1.2 Valg av reagenser

Alle reagenser som ble benyttet var av PCR-kvalitet. Reagensene ble oppbevart på kjøleblokk under analysen. Det samme gjaldt for RNA og cDNA. Hybridiseringsprobene og SYBR Green I ble beskyttet mot lys.

7.1.3 Valg av analysemetode

I oppgaven blir det benyttet en sanntids PCR-metode for kvalitativt å bestemme mengde mRNA av P-glykoprotein. Det finnes per dags dato flere ulike metoder for mRNA analyse.

Vanlige metoder for RNA-deteksjon inkluderer Northern Blotting, in situ-hybridisering, kvalitativ RT-PCR, kvantitativ RT-PCR med mer.

Kvantitativ RT-PCR er den mest brukte metoden for kvantifisering av mRNA-transkripsjonsnivåer grunnet god nøyaktighet og sensitivitet over et meget bredt konsentrasjonsspenn. RT-PCR er en rask og reproducerbar metode. Metoden krever minimalt med RNA, og man slipper etterbehandling av PCR-produktene (31).

Northern blotting er en annen teknikk for å studere genekspressjon. Ved Northern blotting blir mRNA størrelsesseparert ved denaturerende agarosegelelektroforese. Det separerte RNA blir så overført til en nylon-membran. Deretter detekteres RNA med isotopisk eller ikke-isotopisk merket komplementær DNA- eller RNA-prober (28). Denne metoden er ikke så nøyaktig, og ikke så sikker som sanntids-PCR. I tillegg er den både mer tidkrevende og mer tungvint (28).

7.2 Kvantifisering

Ved alle kjøringene ble det analysert triplikater av prøvene, og medianen av de resulterende Cp-verdiene ble brukt til kvantifiseringen. Dette styrker sikkerheten og presisjonen til verdiene som brukes i de videre utregningene. Cp-verdiene blir beregnet automatisk av kvantifiseringsprogramvaren (LightCycler Relative Quantification software) og påvirkes ikke av bruker. Alle amplifiseringsreaksjonene, både med SYBR Green I og hybridiseringsprobeformatet, ble etterfulgt av smeltekurveanalyse av produktene for å bekrefte produktidentitet.

7.2.1 Husholdningsgener

I analysen ble det benyttet tre husholdningsgener, og det var snittet av disse som ble benyttet ved utregning av resultatene. Nivåene av husholdningsgenene kan variere i ulike vev, celler og utviklingstrinn, eller som følge av behandlingen av cellene under eksperimentet. Uansett vil det være sikrere å bruke PCR med husholdningsgener enn Northern blotting når det gjelder studier av genekspressjon.

Det ble valgt tre husholdningsgener som man ikke tror påvirkes i stor grad av steroider. Husholdningsgenenes mRNA er med i prøvene hele tiden, i motsetning til alien-mRNA, som er et alternativ til husholdningsgener. Alien-mRNA er en ekstern RNA-kontroll for deteksjon av hemmere i RNA-prøvene, for kvantitative RT-PCR-eksperimenter.

Alien-mRNA tilsettes etter isolering, og vil dermed ikke være med i hele prøveopparbeidelsen, noe som er en stor svakhet ved denne metoden (33).

Bruk av endogene kvantitative referansegener, som husholdningsgener, er klart bedre enn bruk av eksogene, in vitro-transkriberte RNA-fragmenter. RNA fra en eksogen kontroll blir ikke ko-renset og vil heller ikke reflektere transkripsjonsaktiviteten inne i cellene (31).

7.2.2 Kalibratornormalisering

Kalibratoren som ble brukt var av cDNA, fordi denne er vesentlig mer stabil enn RNA. Isolert total-RNA fra en frisk kontrollperson ble revers-transkribert porsjonsvis. Alt cDNA ble blandet til slutt, og så delt opp i porsjoner på 100 µL som ble fryst ned ved -70 °C. Ved hver PCR-reaksjon ble det tatt med triplikat av kalibratoren.

Metoden inkluderte normalisering mot tre husholdningsgener og kalibrator, samt korreksjon for effektivitetsforskjeller. Dette gjør metoden relativt robust og mindre påvirket av faktorer som forskjeller i RNA-mengde, effektivitet av revers-transkripsjon og lignende.

7.3 De Langerhanske øyene

Årsakene til variasjonene i genuttrykket kan være mange. Her nevnes noen av dem.

7.3.1 Tidsaspekter

Øycellene som ble brukt hadde blitt isolert fra pankreas etter ulik tid fra organuttak. Noen av øyene var helt ferske da de ble inkubert med metylprednisolon, mens andre hadde ligget i 3-4 dager, noe som reduserer kvaliteten på cellene i øyene betraktelig. Det at forsøkene ble startet på ulike tidspunkter etter isolering, kan bidra til de store forskjellene som sees i dette pilotforsøket. Det at bukspyttkjertlene har blitt behandlet ulikt, kan også bidra til variasjon i resultatene. Data på hvilke av øyene som hadde blitt isolert tidlig og hvilke som hadde blitt isolert etter noen døgn, var dessverre ikke tilgjengelig. Det hadde vært av interesse å se om dette påvirker cellenes reaksjon på metylprednisolon.

Informasjon om cellenes stimuleringsindeks var tilgjengelig for 4 av de 6 prøvene som ble analysert. Stimuleringsindeksen sier noe om hvordan cellene reagerer på glukosetilsetning ved at insulinresponsen måles. Man kan på den måten si noe om cellenes tilstand.

Stimuleringsindeksen var målt rett etter metylprednisolon-tilsetning og fem døgn etter tilsetning. I disse utregningene har man sammenlignet kurvene for *ABCB1*-ekspresjon med kurver fra stimuleringsindeksen målt rett etter metylprednisolon-tilsetning. Kurvene vises i Appendiks. Som nevnt, er det betydelig usikkerhet ved måling av stimuleringsindeks. Noe som framgår av resultatene fra donor 3 og 4 hvor dette er utført i to serier for hver donor. Man kan allikevel se en viss tendens til invers sammenheng mellom ekspresjon av *ABCB1* og stimuleringsindeks, i endring fra kontroll-prøve til prøven med laveste konsentrasjon av metylprednisolon. Denne tendensen er ikke konsistent, og kan ikke testes statistisk i dette begrensede pilot-materialet. Eventuelle videre forsøk bør legges opp for å avklare dette nærmere.

7.3.2 Prosedyren for isolering av øycelle-materiale

Isoleringen har skjedd ved håndplukking av cellene, og det er usikkerhet knyttet til mengden celler som har blitt isolert til hver prøve. Det er også sannsynlig at eksokrint vev har fulgt med under isoleringen av øycellene, samt at forholdet mellom endokrint og eksokrint vev har vært ulikt i prøvene. Dette kan føre til ulike uttrykk av gener i de ulike prøvene. Da den relative andelen av ulike celletyper kan være forskjellig i de ulike prøvene, kan dette også føre til forskjeller i husholdningsgen-ekspresjonen. Det er sannsynlig at for eksempel endotelceller i en viss grad er høstet sammen med øyceller, og at *ABCB1*-mRNA som har blitt påvist, kan komme fra endotelcellene. Det skilles heller ikke mellom de ulike endokrine cellene i de Langerhanske øyene, så man kan ikke si noe sikkert om hvilke av cellene i de Langerhanske øyene som har uttrykt P-glykoprotein.

7.3.3 Metylprednisolon-konsentrasjon

En annen usikkerhet ved isolerings- og inkuberingsprosedyren er mengden av tilsatt metylprednisolon som er tatt opp av cellene. Konsentrasjonene som sammenlignes (0, 100, 500 og 1000 µg/ml) er den konsentrasjonen som er tilsatt mediet. Vil man kontrollere dette, må intracellulær konsentrasjon måles.

7.4 Konklusjoner

Det har blitt etablert en metode for bestemmelse av ekspresjon av P-glykoprotein, *ABCB1*, og ved bruk av denne metoden ble det påvist *ABCB1*-mRNA i øycelle-materialet.

Analysene viser at det er stor variasjon i ekspresjonen mellom øycelle-populasjonene.

Man kan fastslå at genuttrykket til P-glykoprotein i øycelle-materialet påvirkes ved inkubering i cellemedium tilsatt metylprednisolon.

Det er imidlertid undersøkt for få cellepopulasjoner til at man kan si noe konkret om hvordan uttrykket endres avhengig av mengde metylprednisolon i cellemediet. Karakteriseringen av cellepopulasjonene har også vært noe usikker med hensyn på varighet etter dødstidspunkt og uttak fra donor. Fordelingen av de ulike celletypene blant de isolerte cellene er også uviss, både med hensyn på endokrine og ikke-endokrine celler. Resultatene viser at genuttrykket endres ulikt i øycelle-materiale fra de forskjellige bukspyttkjertlene. Hos øyene fra noen av bukspyttkjertlene sees så mye som en 38 % økning (donor 2) i cDNA mengden av P-glykoprotein fra kontrollen (som kun har blitt inkubert i medium) og til den første prøven som har blitt innkubert i den laveste mengden metylprednisolon som ble undersøkt, 100 µg/mL. Hos andre igjen sees det motsatte, en nedgang i genuttrykket på 52 % (donor 4) fra kontrollen til den laveste metylprednisolon-mengden (100 µg/mL). Det er allikevel en tendens til at flertallet (5 av 6 donorer) får oppregulert genuttrykket fra kontrollen til den laveste dosen med metylprednisolon.

Oppsummeringsfiguren (figur 13) som viser P-glykoprotein-mRNA-mengden relativt til 3 husholdningsgener (justert for effektivitet og normalisert i henhold til utgangsverdien), viser at genuttrykket i gjennomsnitt øker med ca 20 %. Dette er ikke store forandringen når det gjelder endringer i genekspresjon, og som nevnt er det en rekke usikkerhetsfaktorer relatert til resultatene, i hovedsak basert på mangelfullt karakterisert prøvemateriale.

7.5 Videre studier

Hovedoppgaven demonstrerer en vellykket applikasjon av metoden for ekspresjonsanalyse av P-glykoprotein på et klinisk materiale, og den faktiske påvisning av ekspresjon i øycelle-materialet åpner for videre studier i flere retninger.

Resultatene viser at genekspresjonen av P-glykoprotein blir påvirket av metylprednisolon, som er et vanlig medikament ved transplantasjon.

Det hadde vært ønskelig med bedre kontrollerte ekspresjonsstudier, der forsøksbetingelsene var mer standardiserte. Det er, blant annet, ønskelig med bedre kontroll på opprinnelsen til cellene, tid etter høsting, hvilken tilstand bukspyttkjertelen er i, kontroll på mediet og kontroll

på vaskeprosedyren som brukes etter tilsetning av immunsuppressiva. Hadde alle de Langerhanske øyene blitt isolert etter like lang tid, ville det vært enklere å trekke konklusjoner når det gjelder ekspresjonsendringer etter inkubering i for eksempel metylprednisolon. Andre årsaker til ekspresjonsendringer som cellostress, ytre påvirkning, cellenes tilstand med mer, kunne da utelukkes som årsak til endringene. I denne pilot-studien hadde man ikke kjennskap til fordelingen mellom endokrine og ikke-endokrine celler, og fordelingen mellom betaceller og andre endokrine celler i øyene var heller ikke kjent.

Tilgjengelighet av øycelle-materiale for denne type studie, er koblet til innsamling av bukspyttkjertel som en del av øvrige organuttak fra avdøde for transplantasjon. Øyceller prepareres for klinisk bruk, og overskudd av dette materiale benyttes i forskningssammenheng – som her ved *ABCB1*-ekspresjonsanalyse. Under disse forhold kan naturlig nok forhåndsbetingelsene ikke fullt ut standardiseres. I videre studier bør man identifisere mulige kritiske faktorer som kan påvirke resultatene, og legge opp til at disse registreres så godt som mulig for øycelle-materialet fra hver enkelt donor.

Nå som mRNA fra P-glykoprotein er påvist i øycelle-materiale, vil det være naturlig å prøve å finne ut hvilke av celletypene i de Langerhanske øyene (betaceller, alfaceller, PP-celler, endotelceller med mer) som uttrykker proteinet. Dette kan kanskje gjøres ved for eksempel immunhistokjemi. Dette er en fargingsmetode der antigen i vevet- eller prøven påvises ved tilsetning av merket antistoff. Her hadde det da vært aktuelt med dobbeltfarging. Det vil si å farge de cellene som har insulinutskillelse (betacellene), og de som uttrykker P-glykoprotein. Når celletypen er kjent, må man igjen vurdere hvilke husholdningsgener som er best egnet som intern standard i analysen. Alternativt kunne man relatere et spesifikt protein - eller en annen spesifikk markør - som hovedsakelig finnes i de cellene som uttrykker P-glykoprotein, til antall celler.

Det hadde også vært av interesse å finne pålitelige funksjonsparametere som karakteriserer "cellekvalitet" etter isolering på en mer pålitelig måte enn stimuleringsindeksen. Dette er et generelt problem som det arbeides med på flere hold i forskningen omkring pankreas-øyceller.

En ny studie som bygger på denne pilotstudien, er allerede i oppstartsfasen. I den nye studien legges det mer vekt på isoleringstidspunktet for øyene, slik at inkuberingen skjer med celler

som har så likt utgangspunkt som mulig. Øyene blir i dette forsøket også inkubert i metylprednisolon. Etter å ha studert resultatene fra denne pilotstudien, ble det valgt å inkubere øyene i 200 µg/ml metylprednisolon. Dette for å se om en dose i den nedre delen av doseområdet er tilstrekkelig for å påvirke P-glykoprotein-ekspresjonen. Total-RNA isoleres etter flere tidspunkter, ikke bare etter 48 timer som i denne pilotstudien. Man skal undersøke om kortere eksponering også vil påvirke ekspresjonen av P-glykoprotein. Metoden som skal brukes til ekspresjonsstudiene, er den som ble etablert i dette prosjektet.

Mengden tilsatt metylprednisolon er i pilotstudien den mengden som tilsettes celledietet. Det hadde vært av interesse å måle intracellulær konsentrasjon, og sett om mengden som tilsettes dietet, er i samsvar med den som måles intracellulært. Man kan vurdere ulike analysemetoder for dette. Fordi det er snakk om svært små mengder med prøvemateriale, må det etableres sensitiv metodikk- for eksempel MS/MS, for slike analyser.

Senere kan man prøve seg med mer detaljerte studier, der man prøver å finne ut hvilke immunsuppressiva som påvirker P-glykoprotein-ekspresjonen i de Langerhanske øyene, og hvilke av cellene i øyene som påvirkes. Samt i hvilken grad intracellulær konsentrasjon blir påvirket av P-glykoprotein-endringer.

Man vet at mange vanlige immunsuppressiva er substrater for P-glykoprotein, og både ciklosporin, sirolimus og takrolimus har vist seg å hemme transportpumpen (se tabell 1). Man kan tenke seg at hemming av pumpen kan føre til *høyere* intracellulære konsentrasjoner av immunsuppressiva, og *økt toksisitet* for øycellene. Det å måle intracellulær konsentrasjon av immunsuppressiva før og etter tilsetning av en hemmer for å se om en hemming av P-glykoprotein fører til store endringer i intracellulær konsentrasjon, er av særlig interesse. Dette fordi mange immunsuppressiva, inkludert takrolimus og sirolimus, har vist seg å svekke funksjonen til øycellene ved høye konsentrasjoner (3).

Et av de endelige målene med disse studiene må være å finne ut hvilken immunsuppressiv protokoll som er optimal for transplantasjon av øycelle-materiale. Forhåpentligvis vil økt kunnskap om øycellene og deres genuttrykk ha betydning for øycellenes ”prognose” ved transplantasjon. Dette har betydning for hvor mye øycelle-materiale som må transplanteres, transplantasjonssuksessen og behovet for re-transplantasjoner. Noe som igjen vil være

avgjørende for hvor mange pasienter som kan bli øycelle-transpantert, og hvilken behandlingsrespons og prognose pasientene kan forvente.

8. APPENDIKS

8.1 Reagenser

Reagens/ Kit	Produsent	Artikkelnr.
Ethidium bromide solution	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO	46067
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO	4375
LightCycler FastStart DNA	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	12239272001
Master Hybridization Probes		
LightCycler FastStart DNA	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	300323001
Master SYBR Green I		
LightCycler h-ALAS Housekeeping Gene Set	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3302504001
LightCycler-h-G6PDH Housekeeping Gene Set	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3261883001
LightCycler-h-b2M Housekeeping Gene Set	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3146081001
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit I	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3004007
MagNA Pure LC RNA	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3542394001
Isolation Kit-High Performance		
MS2 RNA 10 A260 units	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	10165948001
PCR Nucleotide Mix	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	11814362001
Primer random p (dN)6 50 A260 units	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	11034731001
Protector RNase Inhibitor	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3335402001
Red Blood Cell Lysis Buffer	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	1814389
SeaKem Gold Agarose 1 %,	Cambrex Bio Science, Rockland, ME	54903
8 well 1 x TBE buffer + ethidium bromide		
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, ME	
TE Buffer, 1 x, Molecular Biology Grade	Promega Corporation, Madison, WI	V6231
Transcriptor Reverse Transcriptase 2000 U	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3531287001
Water, PCR Grade	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	3315932

8.2 RNA-isolering / cDNA-syntese

RNA-isolering

Eluat fra MagNa-pure

Prøveløsning A	Vann	5,7	μL	(800 ug/ml)
	Ms2 RNA	0,3	μL	
	Eluat	5	μL	
	Total	11	μL	

cDNA syntese

0,2 ml PCR rør, totalt 20 μL per rør:		
Antall rør:	18	

Tilsetning til hvert rør:

Primerbinding:

Prøveløsning B	Prøveløsning A	11	μL
	Random primer	2	μL

Settes i Thermocycler 65 °C i 5 min.

Mastermiks RT:

RT Buffer	4	80	μL
Rnase inhibitor	0,5	10	μL
Nukleotid mix	2	40	μL
RT enzym	0,5	10	μL

cDNA syntese:

Prøveløsning B	13	μL
Mastermix RT	7	μL
Total	20	μL

Settes i Thermalcycler og start RT-IMPDPH tinn 3

Prøveløsning C	Vann	533,3	μL
	Ms2 RNA	6,8	μL
	cDNA	360	μL
	Total	900,1	μL

Konst av MS2 RNA i endelig prøve ~10 ug/ml

Momenter og kommentarer til revers-transkripsjonsprosedyren

- Utfør revers transkriptasereaksjonen i blandinger på 20 μL i 200 μL rør.
- Tin alle de nødvendige komponentene og plasser dem på kjøleblokk. Alle reagensene sentrifugeres før åpning.
- Pipetter vann, MS2-RNA, total-RNA og random primer i den nevnte rekkefølgen i henhold til skjema over.
- Bland og sentrifuger. Overfør så rørene til varmeblokken, 65 °C i 5 min.
- Lag en mastermiks av reaksjonsbuffer, RNase-hemmer, deoksynukleotidblandingen og Transcriptor revers transkriptase. Beregn volum av de ulike reagensene ved å multiplisere med summen av antall prøver samt et overskudd på to reaksjoner.
- Ta ut rørene av varmeblokken etter de 5 minuttene og sett disse umiddelbart på is.
- Tilsett 7 μL av mastermiksen til hvert rør. Bland og sentrifuger.
- Sett rørene tilbake på varmeblokken, og sett i gang programmet igjen.
- Etter revers transkripsjon: Bland to deler cDNA med tre deler vann/MS2 RNA. Gå direkte videre til pipettering for PCR eller frys cDNA'et ved – 20°C.

8.3 Tilberedning av primer- og probestamløsninger

Probene bør i minst mulig grad eksponeres for lys i forkant av PCR reaksjonen, i og med at det kan skade fluoroformeringen og redusere fluorescensen.

- Arbeid helst i LAF-benk uten ekstra lys.
- Sentrifuger rørene med lyofiliserte primere og prober før åpning for å unngå at lyofilisatet sitter igjen i korken.
- Lag stamløsninger på 10 μM for primerne og 3 μM for probene ved å tilsette beregnet volum svak TE-buffer eller vann til røret.
- Pakk inn rørene i aluminiumsfolie og legg disse på rulle i minimum 15 minutter. Probene bør ikke - eller kun forsiktig - vortexes fordi det kan føre til at de blir mekanisk ødelagt (Primerløsningene kan eventuelt vortexes).
- Sentrifuger rørene kort før åpning og fordel løsningen i mindre porsjoner (for eksempel 30 μL) til merkede rør som fryses ved -20°C . Holdbarhet minst et år.
- Unngå gjentatt frysing og tining. En porsjon av hver primer og probe kan oppbevares i kjøleskap. Holdbarhet i flere uker/måneder (TIB®MOLBIOL)

8.4 Forberedelser til PCR

Mastermiks til bruk ved amplifisering lages i sterilt miljø i LAF-benk. Det er svært viktig at dette skjer fysisk adskilt fra amplifisering og eventuelle analyser av PCR- produkt. Oppbevar løsningene på is eller kjøleblokk til PCR settes i gang.

- Tin og pipetter nødvendig volum standarder (ABCB1, ALAS, β 2M og G6PDH), prøver, kalibrator, eventuelt RT-negativ kontroll og vann (negativ kontroll) i 1,5 mL Sarstedt rør.
- Beregn volum til mastermiksene ved å multiplisere volumet per reaksjon som er oppgitt i skjema med antall reaksjoner. Det er nødvendig å beregne et par reaksjoner ekstra p.g.a svinn ved pipetteringene.
- Lag mastermikser til PCR i 1,5 mL Sarstedt rør ved å pipettere reagensene i den nevnte rekkefølgen i henhold til skjema.

ABCB1

LC1		3,5
MgCl ₂		
Konsentrasjon (mM)	Volum (μL) til 20 uL	
3,5	2	
1,0	0	

Vann	7	224
MgCl ₂ 25mM	2	64
Primer: ABCB1-1	1	32
Primer: ABCB1-2	1	32
Probe ABCB1-LC1	1	32
Probe ABCB1-LC3	1	32
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	----	----

ABCB1

LC2		3,5
MgCl ₂		
Konsentrasjon (mM)	Volum (μL) til 20uL	
3,5	2	
1,0	0	

Vann	7	224
MgCl ₂ 25mM	2	64
Primer: ABCB1-1	1	32
Primer: ABCB1-2	1	32
Probe ABCB1-LC2	1	32
Probe ABCB1-LC3	1	32
Fast start enzymmiks	2	64
Mastermiks total	15	480

Prøve:cDNA/vann(2+3)	5	160
Totalt	20	640

Antall prøver	29	32
---------------	----	----

8.5 Pipettering i LightCycler-kapillærer

- Velg egnet kjøleblokk for termal sykler formatet, som heter LightCycler karusell.
- Programmer postpipetteringsskjema.
- Programmer hvert pipetteringstrinn ved hjelp av dra og slipp metoden.
- Lagre metoden og start PCR-oppsettet.
- Sett forsiktig korker i LightCycler-kapillærene.
- Sentrifuger LightCycler-karusellen i "Heraeus sepatech, Biofuge 17RS" ved 3000 rpm i 15 sekunder.
- Overfør karusellen til LightCycleren.

8.6 Eksperiment-protokoll; innstillinger i LightCycler-programmet for analysering med prober

Experimental Protocol

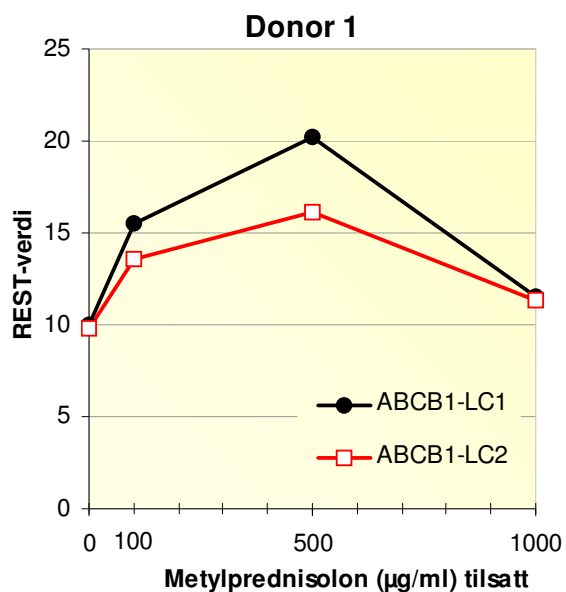
Program:	Denaturing				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	600	20	0	0	0	None	

Program:	Amplifisering				Type:	Quantification	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	10	20	0	0	0	None	
2	58	5	20	0	0	0	Single	
3	72	10	20	0	0	0	None	

Program:	Analyse				Type:	Melting Curves	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	98	300	20	0	0	0	None	
2	45	60	20	0	0	0	None	
3	90	5	0.1	0	0	0	Continuous	

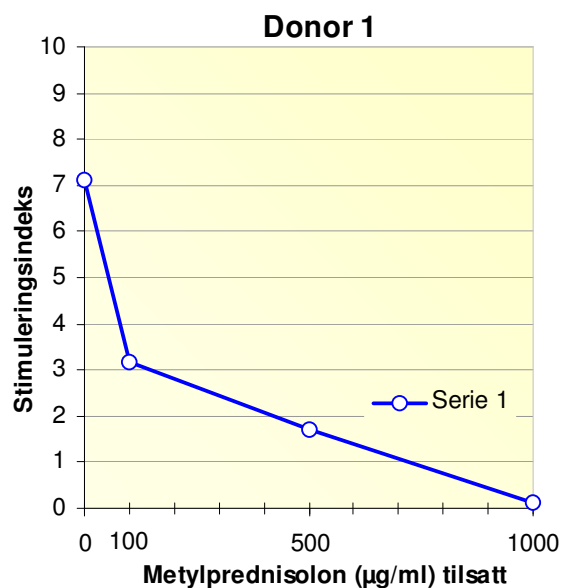
Program:	Avkjøling				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	40	30	20	0	0	0	None	

8.7 Resultater:

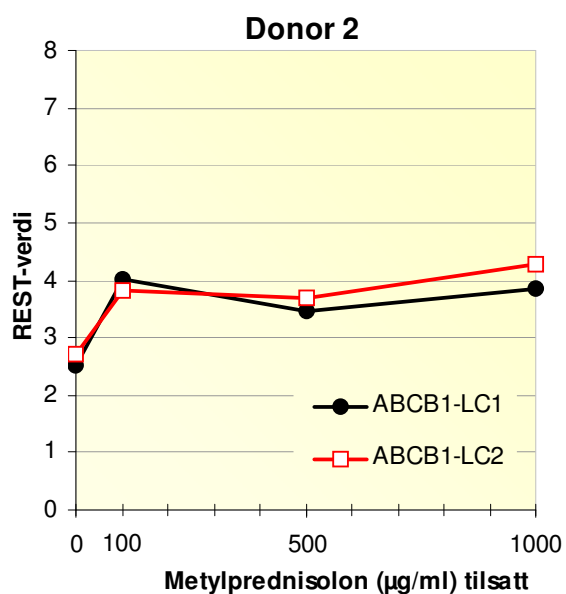


Figur 14. Relativ genekspressjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)

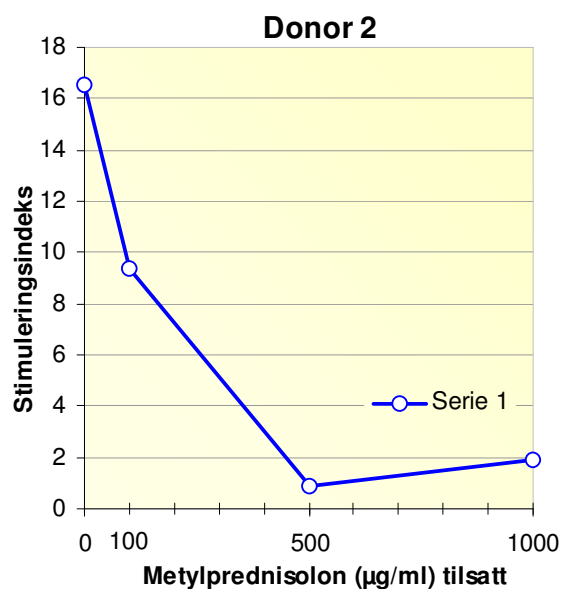


Figur 15. Stimuleringsindeks i øyceller ved inkubering med metylprednisolon

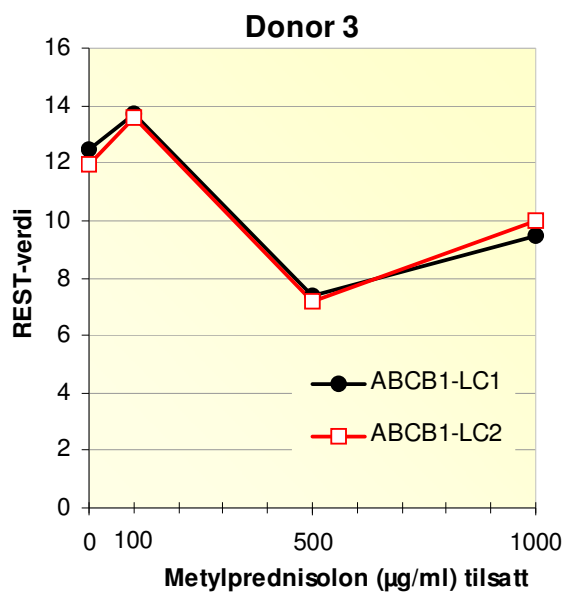


Figur 16. Relativ genekspressjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)

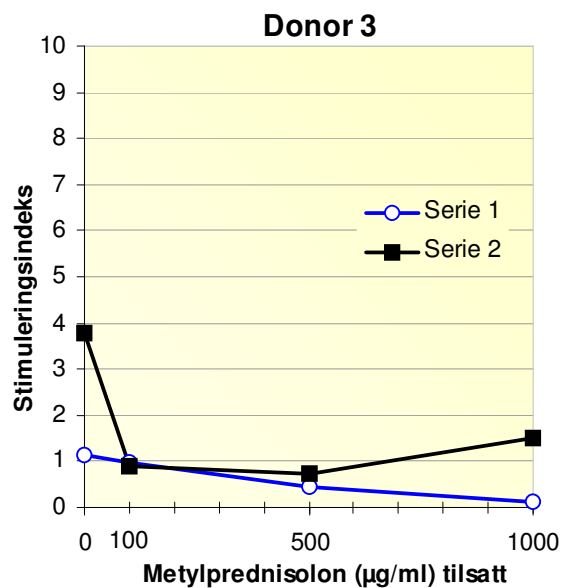


Figur 17. Stimuleringsindeks i øyceller ved inkubering med metylprednisolon



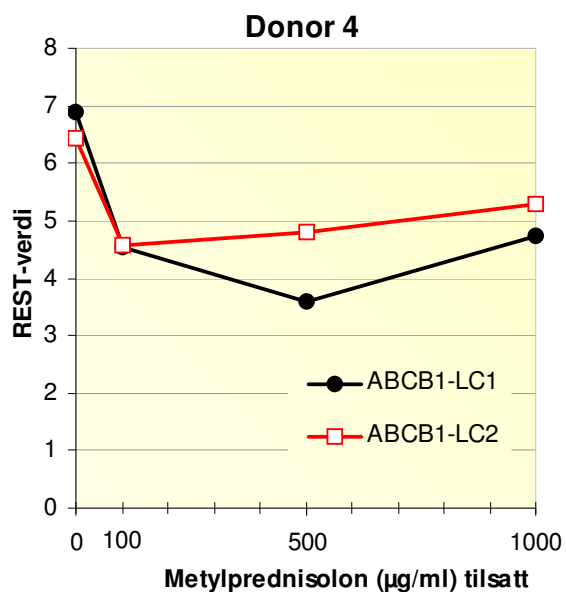
Figur 18. Relativ genekspresjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)



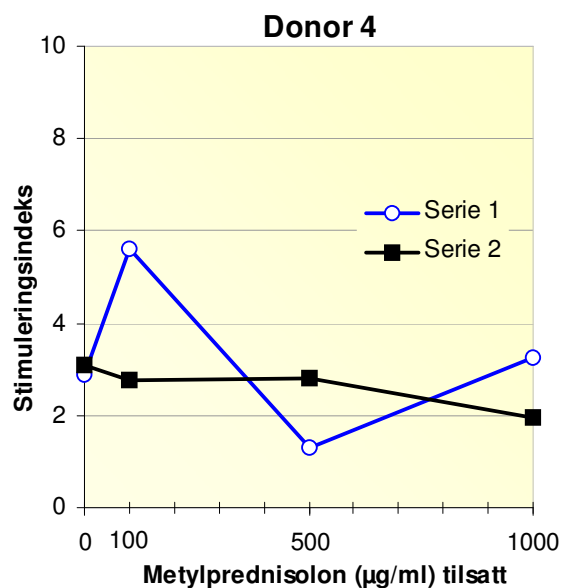
Figur 19. Stimuleringsindeks i øyceller ved inkubering med metylprednisolon

Serie 1 og Serie 2 er to separate isoleringer av samme materiale



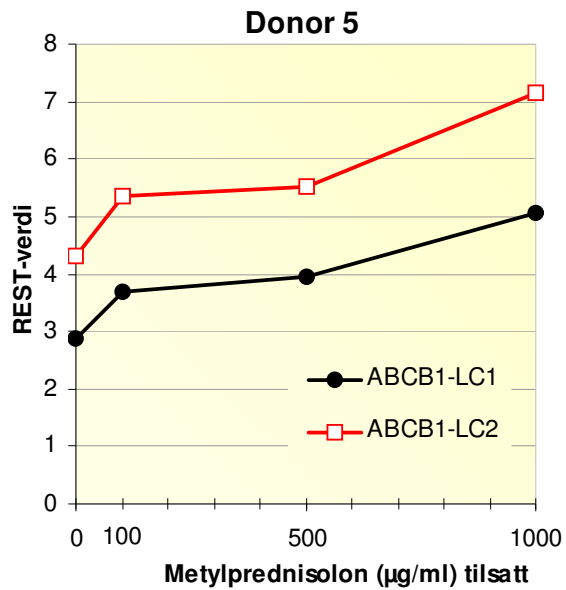
Figur 20. Relativ genekspresjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobene brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)



Figur 21. Stimuleringsindeks i øyceller ved inkubering med metylprednisolon

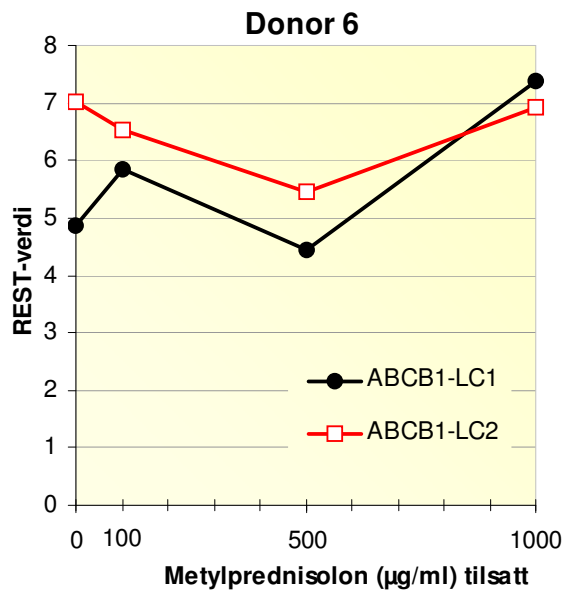
Serie 1 og Serie 2 er to separate isoleringer av samme materiale



Figur 22. Relativ genekspresjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobenes brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)

(Data for stimuleringsindeks i øyceller foreligger ikke for donor 5)



Figur 23. Relativ genekspresjon ved inkubering av øyceller med metylprednisolon.

ABCB1-LC1 og -LC2 er donorprobenes brukt i forsøket. De bindes best til hhv T- og G-polymorfismen (se 5.4)

(Data for stimuleringsindeks i øyceller foreligger ikke for donor 6)

9. LITTERATURLISTE

1. Line, P.-D., Foss, S. (2005). "Organ- og benmargstransplantasjoner ved Rikshospitalet 1969-2005". www.rikshospitalet.no
2. Einrem, B. (2006). "Flere lunge- og levertransplantasjoner i 1.halvår 2006". Rikshospitalet. www.rikshospitalet.no
3. Shapiro, A.M., Ricordi, C., Hering, B.J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R.P., Secchi, A., Brendel, M.D., Berney, T., Brennan, D.C., Cagliero, E., Alejandro, R., Ryan, E.A., DiMercurio, B., Morel, P., Polonsky, K.S., Reems, J.A., Bretzel, R.G., Bertuzzi, F., Froud, T., Kandaswamy, R., Sutherland, D.E., Eisenbarth, G., Segal, M., Preiksaitis, J., Korbitt, G.S., Barton, F.B., Viviano, L., Seyfert-Margolis, V., Bluestone, J., Lakey, J.R. (2006). "International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation." *N Engl J Med.* 355: 1318-1330.
4. Lie, E. (2005). "Øyceller fra levende donor". Norges Diabetesforbund. www.diabetes.no
5. Molden, E. (2004). "[P-glycoprotein--a pump of significance for drug response]." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 124: 2921-2923.
6. Wilkinson, G.R. (2005). "Drug metabolism and variability among patients in drug response." *N Engl J Med.* 352: 2211-2221.
7. Bogen, B., Munthe, L. (2002). "*Immunologi*." 2.ed.
8. Vartdal, F., Thorsby, E. (1999). "[Immunologic reactions in transplantation]." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 119: 3167-3170.
9. Reisaeter, A.V. (1999). "[Kidney transplantation in Norway--a historical perspective]." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 119: 3163-3166.
10. Anonymous. (2006). "*Norsk Legemiddelhåndbok*". www.legemiddelhandboka.no
11. Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten. (2003). "Inhalerbar insulin for pasienter med diabetes". www.kunnskapssenteret.no
12. Nussey, S., Whitehead, S. (2001). "*Endocrinology - An Integrated Approach*". St. George's Hospital Medical School, London, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2001.

13. Myrseth, A.S., Reisæter, A.V. (2003). "Avstøtning.: 1-2". www.rikshospitalet.no
14. Kahan, B.D., Ponticelli, C. (2000). "*Principles and Practice of Renal Transplantation*".
15. Bergan, S., Albrechtsen, D., Bentdal, O. (1999). "[Immunosuppressive agents in organ transplantation]." *Tidsskr Nor Laegeforen*. 119: 3615-3620.
16. Torigoe, K., Harada, T., Kusaba, H., Uchiumi, T., Kohno, K., Green, E.D., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Schlessinger, D., Kuwano, M., Wada, M. (1998). "Localization of 67 exons on a YAC contig spanning 1.5 Mb around the multidrug resistance gene region of human chromosome 7q21.1." *Genomics*. 49: 14-22.
17. Hoffmann, U., Kroemer, H.K. (2004). "The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance." *Drug Metab Rev*. 36: 669-701.
18. Mahadevan, D., Shirahatti, N. (2005). "Strategies for targeting the multidrug resistance-1 (MDR1)/P-gp transporter in human malignancies." *Curr Cancer Drug Targets*. 5: 445-455.
19. Ieiri, I., Takane, H., Hirota, T., Otsubo, K., Higuchi, S. (2006). "Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy." *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2: 651-674.
20. Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nat Rev Cancer*. 2: 48-58.
21. Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M. (2006). "Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket." *Biochem J*. 396: 537-545.
22. Info från Läkemedelsverket. (2002). "P-glykoprotein- ett betydelsefullt försvarsprotein mot främmande substanser och ett viktigt mål för läkemedelsinteraktioner. www.lakemedelsverket.se
23. Brown, T.A. (2002). "*Genomes*." 2nd ed.ed. New York and London: Garland Science.
24. Kroetz, D.L., Pauli-Magnus, C., Hodges, L.M., Huang, C.C., Kawamoto, M., Johns, S.J., Stryke, D., Ferrin, T.E., DeYoung, J., Taylor, T., Carlson, E.J., Herskowitz, I., Giacomini, K.M., Clark, A.G. (2003). "Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene." *Pharmacogenetics*. 13: 481-494.

25. Pennisi, E. (2003). "Human genome. A low number wins the GeneSweep Pool." *Science*. 300: 1484.
26. Bremer, S. (2004). "IMPDH type I og II ekspresjon i blodceller: Utvikling, validering og etablering av relativ kvantitativ RT-PCR analyse. Hovedfagsoppgave i farmakologi farmasøytisk institutt, oslo:
27. Roche Applied Science. (2003). "LightCycler, Technical Note No.LC 11/update 2003. www.roche-applied-science.com
28. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. (1998). "*Essential Cell Biology*". Garland Publishing, Inc.
29. Albermann, N., Schmitz-Winnenthal, F.H., Z'graggen, K., Volk, C., Hoffmann, M.M., Haefeli, W.E., Weiss, J. (2005). "Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver." *Biochem Pharmacol*. 70: 949-958.
30. Anonymous. (2001). "Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking.
31. Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." *Biochem Biophys Res Commun*. 313: 856-862.
32. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res*. 30: e36.
33. Anonymous. (2006). "Product info- **Alien® QRT-PCR Inhibitor Alert**. www.stratagene.com